

EINE NEUE KLASSE VON PEPTIDDERIVATEN: N-[α -AMINOACYL]-N,N'-METHYLEN-DIPEPTIDE

INAUGURALDISSERTATION
ZUR
Erlangung der Würde eines Doktors der Philosophie
vorgelegt der
Philosophisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Basel

von
Heinz Dürrenberger
aus Lupsingen (BL)

Clausthal-Zellerfeld
Bönecke-Druck
1974

EINE NEUE KLASSE VON PEPTIDDERIVATEN:

N - $[\alpha$ -AMINOACYL]- N,N' -METHYLEN-DIPEPTIDE

INAUGURALDISSERTATION

zur

Erlangung der Würde eines Doktors der Philosophie

vorgelegt der

Philosophisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität Basel

von

Heinz Dürrenberger

aus Lupsingen (BL)

Clausthal-Zellerfeld

Böneck-Druck

1974

Genehmigt von der Philosophisch-Naturwissenschaftlichen
Fakultät auf Antrag der Herren:

Prof. Dr. C. C. Grob

Prof. Dr. M. Brenner

Basel, den 3. Dezember 1974

Prof. Dr. E. Kellenberger

Dekan



Die vorliegende Arbeit wurde unter der Leitung von
Herrn Professor Dr. M. Brenner am Institut für
Organische Chemie der Universität Basel ausgeführt.

Herrn Professor Dr. M. Brenner möchte ich für seine
Hilfe und sein Interesse, das er dieser Arbeit ent-
gegenbrachte, herzlich danken.

INHALTSVERZEICHNIS

Verzeichnis der Abkürzungen	1
1. Einleitung	3
2. Terminale N,N'-Alkylidenpeptide	6
2.1 In der Literatur beschriebene 4-Imidazolidinone	6
2.1.1 Reaktionen von Carbonylverbindungen mit Aminosäurederivaten und Peptiden	6
2.1.2 Darstellung des Reaktionsverlaufes-Nebenprodukte	9
2.2 Synthese von neuen Imidazolidinonen	12
2.2.1 Wahl der Dipeptide	12
2.2.2 Wahl der Carbonylkomponente	14
2.2.3 Reaktionsbedingungen	16
2.2.4 Aufarbeitung und Reinigung der Rohprodukte	19
2.2.5 Diskussion des Reaktionsverlaufes	21
2.3 Chemische Eigenschaften der terminalen Imidazolidinone	24
2.3.1 Haltbarkeit und Beständigkeit - Solvolyseseigenschaften	24
2.3.1.1 Imidazolidinon-Hydrochloride	24
2.3.1.2 Freie Imidazolidinone	26
2.3.2 Hydrolyse	26
2.3.3 Basizität der N,N'-Alkylidenpeptide	30
2.3.4 Acylierbarkeit der N,N'-Alkylidenpeptide	33
2.3.4.1 Acylierungen mit Essigsäureanhydrid und Benzoylchlorid	34
2.3.4.2 Acylierungen mit Carbobenzoylchlorid	35

3.	Nichtterminale N,N'-Alkylidenpeptide	37
3.1	Synthese nichtterminaler Peptidimidazolidinone	37
3.2	Acylierungen der Methylenimidazolidinone	38
3.2.1	Kupplungen unter Verwendung gemischter Kohlen- säureanhydriden	38
3.2.1.1	Acylierungen mit Z-Gly	39
3.2.1.2	Acylierungen mit Z-Val	41
3.2.1.3	Acylierungen mit anderen N-Acyl- α -Aminosäuren	43
3.2.2	Kupplungen unter Verwendung von Dicyclohexyl- carbodiimid (DCCI)	44
3.2.3	Kupplungen unter Verwendung von 2-Pyridyl- thiolethern	47
3.2.3.1	Acylierungen mit Z-Gly-SPy	49
3.2.3.2	Acylierungen mit Z-Val-SPy	50
3.2.4	Diskussion	51
3.3	Acylierungen der Aethylidenimidazolidinone	52
3.3.1	Acylierungen von $\begin{array}{c} \text{CHR} \\ \\ \text{Phe-Ala-OBut} \end{array}$ ($\text{R}=\text{CH}_3$) mit Z-Gly und Chlorameisensäure-i-butylester	53
3.3.2	Acylierungen von $\begin{array}{c} \text{CHR} \\ \\ \text{Phe-Ala-OBut} \end{array}$ ($\text{R}=\text{CH}_3$) mit Z-Val und Chlorameisensäure-i-butylester	55
3.3.3	Acylierungen mit Z-Val-SPy	56
3.3.4	Diskussion	57
3.4	Acylierung eines Cyclohexylidenimidazolidinons	57
4.	Vergleichssubstanzen	59
4.1	Synthese der unverbrückten Vergleichstriptide	59
4.2	Abspaltung der Schutzgruppen	60
5.	Physikalischer und chemischer Vergleich zwischen verbrückten und unverbrückten Peptiden	62
5.1	Physikalisches Verhalten - Instrumentalanalyse	63

5.1.1	UV-Spektren	63
5.1.2	CD-Spektren	65
5.1.3	IR-Spektren	68
5.1.4	NMR-Spektren	72
5.1.4.1	N-terminale Alkylidenpeptidester und entsprechenden Vergleichspeptidester	73
5.1.4.2	Geschützte und deblockierte N,N'-Methylen-tripeptide und entsprechende Vergleichspeptide	75
5.1.5	MS-Spektren	78
5.1.6	Optisches Drehvermögen	82
5.2	Chemisches Verhalten	84
5.2.1	Verhalten beim Abspalten von Schutzgruppen	84
5.2.2	Totalhydrolyse	85
5.2.3	DC - Verhalten	86
5.2.4	Enzymatischer Abbau	87

EXPERIMENTELLER TEIL

6.	Allgemeines	89
7.	Methoden	90
7.1	Dünnschichtchromatographie (DC)	90
7.2	Dickschichtchromatographie	91
7.3	Säulenchromatographie (SC)	91
7.4	Hydrolyseversuche	92
7.4.1	Hydrolyse der N-terminalen Imidazolidinonpeptide	92
7.4.2	Totalhydrolyse	93
7.5	Nachweis der Carbonylkomponenten durch Vergleich der 2,4-Dinitrophenylhydrazone	93
7.6	Titrationen der N-terminalen Imidazolidinonpeptide - pK-Bestimmung	94

7.6.1	pK-Bestimmung aus dem Hydrolysegrad des Imidazolidinon-Hydrochlorids	94
7.6.2	Titration der freien Imidazolidinone in 60-proz. Dioxan	94
7.6.3	Titration der freien Imidazolidinone in Eisessig	95
7.7	Enzymatischer Abbau der deblockierten Tripeptide	97
8.	Synthese der Vergleichspeptide	98
8.1	Aminosäure-t-butylester Hydrochloride	98
8.2	Z-Dipeptid-t-butylester	98
8.3	Dipeptid-t-butylester	99
8.4	Z-Tripeptid-t-butylester	100
8.4.1	Carbobenzoxymethyl-phenylalanyl-alanyl-t-butylester	100
8.4.2	Tabelle der Z-Tripeptid-t-butylester	101
8.5	Freie Tripeptide	102
8.5.1	Methoden zur Schutzgruppenabspaltung	102
8.5.1.1	Abspaltung der t-Butylgruppe	102
8.5.1.2	Abspaltung der Carbobenzoxygruppe	102
8.5.2	Glycyl-phenylalanyl-alanin	102
8.5.3	Tabelle freier Tripeptide	103
9.	Synthese terminaler N,N'-Alkyliden-dipeptid-ester	104
9.1	N,N'-Methyldipeptid-t-butylester-Hydrochloride	104
9.1.1	N,N'-Methylen-phenylalanyl-alanyl-t-butylester Hydrochlorid	104
9.1.2	Tabelle der N,N'-Methyldipeptid-t-butylester Hydrochloride	105
9.2	N,N'-Aethyliden-phenylalanyl-alanyl-t-butylester Hydrochlorid	105

9.3	N,N'-Cyclohexyliden-phenylalanyl-alanyl-t-butylester Hydrochlorid	106
9.4	N,N'-Alkyliden-phenylalanyl-alanyl-t-butylester	107
10.	Acylierung der N,N'-Alkyliden-dipeptidester	108
10.1	Acylierungsmethoden	108
10.1.1	Acylierung mit Essigsäureanhydrid	108
10.1.2	Acylierung mit Benzoylchlorid	108
10.1.3	Acylierung mit Carbobenzoxychlorid	108
10.2	N-Acyl-N,N'-Alkyliden-dipeptid-t-butylester	109
10.2.1	N-Acyl-N,N'-Methylen-dipeptid-t-butylester	109
10.2.2	N-Acyl-N,N'-Aethyliden-dipeptid-t-butylester	110
11.	Synthese nichtterminaler N,N'-Alkyliden-tripeptide	112
11.1	Geschützte N,N'-Alkyliden-tripeptide	112
11.1.1	Kupplungsmethoden	112
11.1.1.1	Kupplungen unter Verwendung gemischter Kohlen-säureanhydride	112
11.1.1.2	Kupplungen unter Verwendung von Dicyclohexyl-carbodiimid	112
11.1.1.3	Kupplungen unter Verwendung von 2-Pyridyl-thiolethern	113
11.1.2	N-(α -Aminoacyl)-N,N'-Methylen-dipeptid-t-butyl-ester	114
11.1.2.1	N-(Carbobenzoxy-glycyl)-N,N'-Methylen-phenyl-alanyl-alanyl-t-butylester	114
11.1.2.2	N-(Carbobenzoxy-valyl)-N,N'-Methylen-phenyl-alanyl-alanyl-t-butylester	116
11.1.2.3	Tabelle der N-(α -Aminoacyl)-N,N'-Methylen-dipeptid-t-butylester	117
11.1.3	N-(α -Aminoacyl)-N,N'-Aethyliden-dipeptid-t-butylester	118

11.1.3.1	N-(Carbobenzoxy-glycyl)-N,N'-Aethyliden-phenylalanyl-alanyl-t-butylester	118
11.1.3.2	N-(Carbobenzoxy-valyl)-N,N'-Aethyliden-phenylalanyl-alanyl-t-butylester	119
11.2	Freie N,N'-Alkyliden-tripeptide	120
11.2.1	Abspaltung der Schutzgruppen	120
11.2.2	N-(α -Aminoacyl)-N,N'-Methylen-dipeptide	120
11.2.2.1	N-Glycyl-N,N'-Methylen-phenylalanyl-alanin	120
11.2.2.2	N-Valyl-N,N'-Methylen-phenylalanyl-alanin	121
11.2.2.3	Tabelle der N-(α -Aminoacyl)-N,N'-Methylen-dipeptide	121
11.2.3	N-(α -Aminoacyl)-N,N'-Aethyliden-dipeptide	122
11.2.3.1	N-Glycyl-N,N'-Aethylen-phenylalanyl-alanin	122
	Zusammenfassung	123
	Literaturverzeichnis	125
	Lebenslauf	128

ABKUERZUNGEN

Die in dieser Arbeit verwendeten Abkürzungen von Aminosäuren, Peptiden und ihren Derivaten folgen den Empfehlungen der 'IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature' (51).

Zur Benennung und Abkürzung der Alkylidenpeptide: vgl. F. Cardinaux, Diss. Basel (1972) und F. Cardinaux, M. Brenner, in 'Proceedings of the XI European Peptide Symposium' (Northholland, Amsterdam 1974).

()	Zahlen beziehen sich auf das Literaturverzeichnis
[]	Zahlen beziehen sich auf die im experimentellen Teil beschriebenen Peptidderivate.
A%	Ausbeute in Prozent
Ac ₂ O	Essigsäureanhydrid
CAIE	Chlorameisensäure-i-butylester
CTR	Chlor-Tolidin Reagens
DC	Dünnschichtchromatographie
DCCI	Dicyclohexylcarbodiimid
DCH	Dicyclohexyl-harnstoff
DMF	N,N-Dimethylformamid
DNPH	2,4-Dinitrophenylhydrazon
EtOAc	Essigsäure-äthylester
EtOH	Aethanol
FM	Fliessmittel
h	Stunde
HAc	Essigsäure (Eisessig)
Lsg.	Lösung
LM	Lösungsmittel

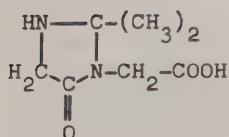
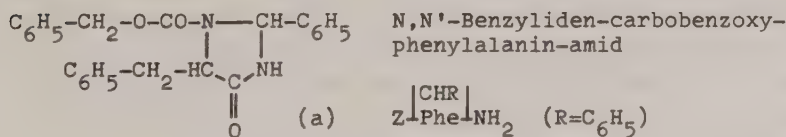
MeOH	Methanol
MG	Molekulargewicht
NHR	Ninhydrin-Reagens
NMM	N-Methyl-morpholin
NMR :	
(s)	Singulett
(d)	Dublett
(t)	Triplett
(qa)	Quadruplett
(qi)	Quintett
(m)	Multipllett
RZ	Reaktionszeit
T	Temperatur
TFA	Trifluoressigsäure
UK	Umkristallisation
Vak	Vakuum
Z-	Carbobenzoxy-

1. EINLEITUNG

Reaktionen von Aldehyden und Ketonen mit Verbindungen, die sowohl eine Aminogruppe als auch eine Amidgruppe besitzen, sind in der Literatur bekannt. Mögliche Reaktionsprodukte sind neben α -Aminoalkoholen, Schiff'schen Basen und Oxazolidinonen - die zumeist nur als Zwischenprodukte auftreten - heterocyclische Verbindungen, die sowohl den Amino- wie den Amid-Stickstoff in ihrem Ringsystem enthalten.

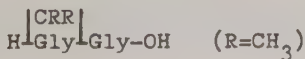
Als Erste beschrieben Davis und Levy (1) Reaktionsprodukte, die bei der Kondensation von α -Phenylglycinamid mit Aceton entstehen, als 4-Imidazolidinonderivate von Aminosäureamiden. In der Folge bestätigen Arbeiten verschiedener Autoren das Auftreten von 4-Imidazolidinonen als Produkte bei Reaktionen von Carbonylverbindungen mit primären oder sekundären Aminosäureamiden oder Peptiden mit freier N-terminaler Aminogruppe.

Kondensationsprodukten, die bei der Umsetzung von Benzyl-oxycarbonylphenylalaninamid mit Benzaldehyd (a) entstehen, wurde ebenso eine 4-Imidazolidinonstruktur zugeschrieben, wie auch dem Produkt der Umsetzung von Glycyl-Glycin mit Aceton (b), (2)(3).

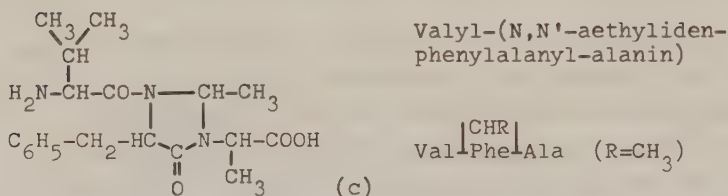


(b)

N,N'-Isopropyliden-glycyl-glycin



Die so erhaltenen Verbindungen lassen sich ausgehend vom Heterocyclus als 4-Imidazolidinonderivate bezeichnen. Da ihre Darstellung von Aminosäurederivaten oder Peptiden ausgeht, sind sie, um der Peptidherkunft gerecht zu werden, besser als N,N'-Alkyliinderivate von Peptiden zu bezeichnen. Dies erlaubt nicht nur die eindeutige Bezeichnung terminaler (b), sondern auch allfälliger nichtterminaler N,N'-Alkyliinderpeptide (c).



Die in der Peptidchemie gebräuchliche Kurzschreibweise lässt sich durch die Einführung eines Zusatzsymbols $\begin{array}{|c|} \text{CRR} \\ \hline \end{array}$ sowohl zur Bezeichnung terminaler wie nichtterminaler Alkyliinderpeptide (im folgenden häufig auch als Imidazolidinonpeptide oder verbrückte Peptide bezeichnet) beibehalten.

Währenddem terminale N,N'-Alkyliinderpeptide teilweise bereits systematisch untersucht und hergestellt wurden - sowohl was verschiedene Carbonylkomponenten als auch Peptide betrifft - sind nichtterminale N,N'-Alkyliinderpeptide bisher nicht bekannt. Versuche zu ihrer Synthese durch Aminoacylierung terminaler Alkyliinderpeptide scheiterten an deren Eigenschaften, den Reaktionsbedingungen und der Wahl der Acylierungsmethode.

Das Gelingen einer Synthese dürfte abhängig sein von einer systematischen Untersuchung der Eigenschaften der terminalen

Alkylidenpeptide, der Kupplungsmethoden und -bedingungen und der die Reaktion sehr stark beeinflussenden sterischen Verhältnisse.

Die Untersuchungen, welche den Gegenstand der vorliegenden Dissertation bilden, hatten die Synthese nichtterminaler N,N'-Alkylidenpeptide zum Ziel und brachten folgende Ergebnisse:

1. Die Synthese nichtterminaler N,N'-Alkylidenpeptide durch schrittweisen Aufbau über terminale Alkylidenpeptide ist möglich.
2. Dies gelingt durch direkte Aminoacylierung terminaler Alkylidenpeptide trotz deren stark vermindelter Basizität. Der Erfolg der Acylierungsreaktion wird durch die sterischen Verhältnisse der Reaktionspartner bestimmt.
3. Die Verwendbarkeit der Alkylidengruppe als Aminoschutzgruppe beschränkt sich auf raumerfüllende Gruppierungen.
4. Die überbrückten Peptide unterscheiden sich in ihren chemischen, physikalischen und biochemischen Eigenschaften wesentlich von ihren unverbrückten Vergleichszeptiden.

Als Vertreter der nichtterminalen N,N'-Alkylidenpeptide werden im folgenden speziell die der Synthese besonders gut zugänglichen N-(α -Aminoacyl)-N,N'-Methylen-dipeptide¹⁾ diskutiert.

1) Zur Nomenklatur von N,N'-Alkylidenpeptiden: vgl.

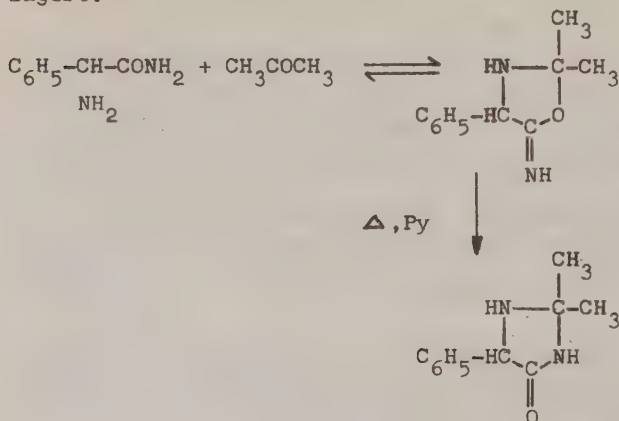
F.Cardinaux u. M.Brenner, in "Proceedings of the XIth European Peptide Symposium" (Northholland, Amsterdam 1974)

2. TERMINALE N,N'-ALKYLIDENPEPTIDE

2.1 In der Literatur beschriebene 4-Imidazolidinone

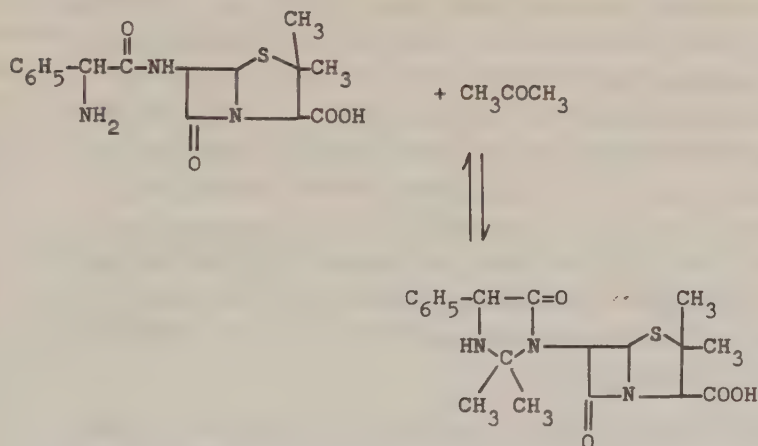
2.1.1 Reaktionen von Carbonylverbindungen mit Aminosäurederivaten und Peptiden

Reaktionen von Aminosäureamiden mit Aldehyden und Ketonen finden in der Literatur nur sporadisch Erwähnung. Als Erste beschrieben Davis und Levy (1) die Kondensation von α -Phenylglycinamid mit Aceton zu einem Oxazolidin, das durch Erhitzen in Pyridin zu einem 4-Imidazolidinon umlagert:



Die Reaktion von Ampicillin, einem Peptidderivat der Penicillinsäure, mit Aceton führten Hardcastle (4) unter mildesten Bedingungen zum Hetacillin, einem 4-Imidazolidinon. Auf Grund der Herstellungsbedingungen glaubte Hardcastle zuerst an eine Oxazolidin-Struktur. Eine

Röntgenstrukturanalyse bewies dann jedoch das Vorliegen der 4-Imidazolidinonstruktur, nachdem auch eine vermutete Schiff'sche Base auf Grund chemischer Ueberlegungen ausser Betracht gefallen war.

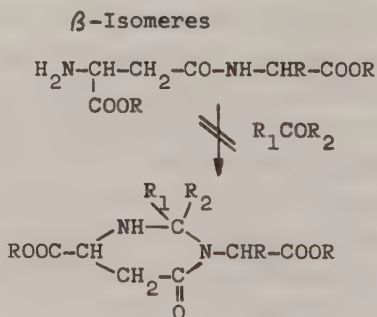
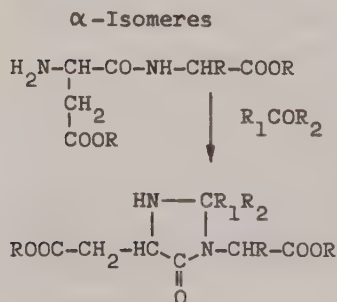


Die 4-Imidazolidinon-Struktur des Hetacillin überraschte weniger, als kurze Zeit später du Vigneaud (5) an Oxytocin die Bildung eines 4-Imidazolidinons nachweisen konnte.

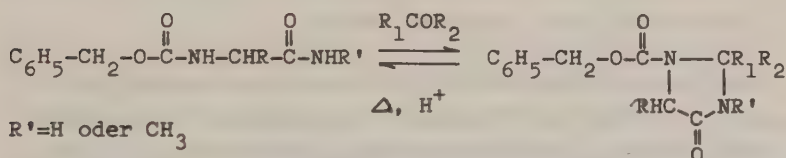
Ebenfalls unter milden Bedingungen können 4-Imidazolidinone aus typischen Peptiden entstehen. Bei der Hydrogenolyse von Carbobenzoxypeptiden unter neutralen und schwach basischen Bedingungen in Alkohol gelangte die Cibagruppe (6)(7) zu Derivaten unbekannter Struktur, welche sich durch aktive Ester nicht mehr aminoacylieren liessen. Cardinaux (8) zeigte, dass diese unbekannten Produkte 4-Imidazolidinone darstellen, die sich unter den Bedingungen der Hydrierung gebildet hatten. Sie entstehen durch Kondensation des eigentlich erwarteten Peptidesters mit Acetaldehyd oder Formaldehyd, welche sich durch Oxidation von Triäthylamin oder

Alkohol durch Luft-Sauerstoff unter dem Einfluss des Pd-Katalysators in situ gebildet haben. Cardinaux gelang es auch, die 4-Imidazolidinonderivate durch Kondensation von Peptiden mit Aldehyden in Alkohol-Wasser Gemischen herzustellen, ohne die Beteiligung von Triäthylamin, Pd-Kohle oder Luft-Sauerstoff. Aehnlich wie Cardinaux aus Peptidestern, gelang Panetta (2) die Darstellung von 4-Imidazolidinonen aus den Natriumsalzen verschiedener Dipeptide durch Umsetzung mit Aceton, Cyclohexanon oder Isobutyraldehyd als Carbonylkomponenten. Hexafluoro-aceton (9) zeigte ein anderes Verhalten gegenüber dem Diglycin-Na-Salz: als einziges Reaktionsprodukt entstand ein Oxazolidin, währenddem Kondensationen von Hexafluoro-aceton mit α -Methylalanyl- α -methylalanin das erwartete 4-Imidazolidinon ergaben.

Eine praktische Anwendung ergab die Bildung von 4-Imidazolidinonen bei der Trennung von α -L-Aspartyl-Dipeptidestern von ihren β -Isomeren. Während Methyl- und Aethyl-ester von α -L-Aspartyl-phenylalanin resp. -tyrosin mit Aceton, Methyl-Aethylketon und Cyclohexanon ohne Katalysator zu 4-Imidazolidinonen reagieren, zeigen die β -Isomeren dieser Peptide keine Reaktion mit diesen Carbonylkomponenten. Ariyoshi (10) nützte diese Tatsache zur Trennung der α - von den β -Isomeren.



Im Gegensatz zu den milden Bedingungen bei der Synthese von Hetacillin und den 4-Imidazolidinonen aus typischen Peptiden (du Vigneaud, Cardinaux, Panetta) erfordern Kondensationen von Aminosäureamiden mit geschützter Aminogruppe wesentlich schärfere Bedingungen. In siedendem Benzol als Lösungsmittel und mit Sulfonsäure als Katalysator gelang Zehavi (2) die Synthese von 4-Imidazolidinonen aus primären und sekundären Carbobenzoxyminosäureamiden und Isobutyraldehyd, Benzaldehyd und Cyclohexanon:



2.1.2 Darstellung des Reaktionsverlaufes - Nebenprodukte

Die Reaktionen von Carbonylverbindungen mit Aminosäurederivaten oder Peptiden zu 4-Imidazolidinonen scheinen je nach den verwendeten Peptiden und Aldehyden oder Ketonen verschieden zu verlaufen. Diese Verschiedenheit bezieht sich nicht nur auf unterschiedliche Bedingungen oder Reaktionszeiten, sondern es werden auch verschiedene Zwischenprodukte und Nebenprodukte postuliert.

Davis und Levy (1) gelangten bei der Umsetzung von α -Aminoacetamid mit Aceton in einer Gleichgewichtsreaktion zu einem Produkt, welches nach Erhitzen in Pyridin in ein 4-Imidazolidinon überging. Als mögliches Zwischenprodukt wurde sowohl das Auftreten eines Oxazolidins als auch einer Schiff'schen Base diskutiert: die unter gleichen Bedingungen erfolgte

Umsetzung von Aminoacetamid mit Benzaldehyd verläuft unter Bildung einer Schiff'schen Base, Daasch (11). Auf Grund von Untersuchungen von Cook (12), der die Kondensation von Aceton mit Aminoacetonitril beschrieben hatte, neigte Davis dazu, dem Oxazolidin als Zwischenprodukt den Vorrang einzuräumen, obwohl die grosse Hydrolyseempfindlichkeit und das Acylierungsverhalten eher auf das Vorliegen einer Schiff'schen Base hindeuteten. Cope (13) zeigte anhand der Reaktionen von Aldehyden und Ketonen mit α -Aminoäthanolen, dass je nach der Art der Substituenten entweder Oxazolidine oder Schiff'sche Basen gebildet werden.

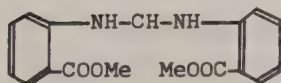
Für eine Schiff'sche Base als Zwischenprodukt spricht die Tatsache, dass bei der Kondensation von Methylaminoacetamid mit Aceton kein isolierbares Zwischenprodukt auftritt. Die Bildung einer Schiff'schen Base ist hier durch die sekundäre Aminogruppe verunmöglicht.

Ein anderes Reaktionsverhalten als Aceton zeigt auch Cyclohexanon. Auch hier liess sich kein Zwischenprodukt isolieren. Der Grund dafür dürfte in den wesentlich höheren Reaktions-temperaturen von bis zu 100°C liegen, die ein nachträgliches Erhitzen in Pyridin zur Umlagerung in die 4-Imidazolidinonstruktur erübrigten.

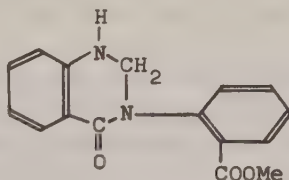
Deutungen zum Reaktionsverlauf von Aldehyden oder Ketonen mit Peptiden verdanken wir vor allem du Vigneaud (5). Bei der Strukturaufklärung von Aceton-Oxytocin überprüfte er das Auftreten einer Schiff'schen Base als Zwischenprodukt der Reaktion von Oxytocin und verschiedenen Modellsubstanzen mit Aceton. Während er bei der Reaktion von Oxytocin mit Aceton eine Schiff'sche Base als Zwischenprodukt nicht nachweisen konnte, gelang ihm dies bei einer Modellsubstanz: eine 60% wässrige Lösung von Aceton und S-Benzyl-

L-cysteinyl-L-prolyl-L-leucyl-glycinamid wurde bei pH 5 mit Natriumborhydrid umgesetzt; nach Aufarbeitung und Reinigung wurde N-Isopropyl-S-benzyl-L-cysteinyl-L-prolyl-L-leucyl-glycinamid in guter Ausbeute isoliert. Eine Schiff'sche Base scheint aber nicht die Voraussetzung zur Bildung eines 4-Imidazolidinons zu sein. L-Prolyl-L-leucyl-glycinamid lässt sich in acetonischer Lösung analog dem Methylaminoacetamid in ein 4-Imidazolidinonderivat überführen, obwohl der sekundäre Aminstickstoff des Prolins die Bildung einer Schiff'schen Base verunmöglicht.

Für das Auftreten eines α -Aminoalkohols als Zwischenprodukt der Reaktion von Aminen mit Aldehyden spricht eine Untersuchung von Smith (14) über 1,2,3,4-Tetrahydro-4-oxochinazolin. Methylantranilat setzt sich bei 0°C in Petroläther mit Benzaldehyd oder p-Methyl-benzaldehyd zum entsprechenden α -Aminoalkohol um, der in kristalliner Form erhalten wurde. Setzt man zu dieser Reaktion Salzsäure als Katalysator zu und führt man sie überdies nicht in Petroläther sondern in Aethanol durch, so entsteht ein Gemisch von zwei Produkten (a) und (b):



(a)



(b)

1 Mol Benzaldehyd kondensiert in einem ersten Schritt mit 2 Mol Methyl-Anthranilat unter Einwirkung des Katalysators zu (a) und dieses cyclisiert in der Folge zu einem substituierten 1,2,3,4-Tetrahydro-4-oxochinazolin (b).

Wird bei diesen Reaktionen anstelle von Methyl-Anthrani-lat Anthranilamid verwendet, so entsteht bei der Reaktion mit aromatischen Aldehyden anstelle der α -Aminoalkohole oder Aminoacetale eine Schiff'sche Base. Das Auftreten eines α -Aminoalkohols als Vorstufe zur Bildung der Schiff'schen Base erscheint gegeben. Sie kann im Fall Anthranilamid und Nitro-Benzaldehyd isoliert werden, nicht aber mit Benzaldehyd, p-Methylbenzaldehyd oder Piperonal als Carbo-nylverbindung. Mit letzteren erfolgt eine Isomerisierung zu den 1,2,3,4-Tetrahydro-4-oxochinazolin, die vergleich-bar ist mit der Cyclisierung bei der Darstellung von 4-Imidazolidinonen.

2.2 Synthese von neuen Imidazolidinonen

Systematische Darstellungen von N,N'-Alkylidenpeptiden unter Verwendung verschiedener Carbonylkomponenten und Peptide finden wir nur bei Panetta (3). Bei diverser Variation in der Auswahl der Peptide verwendete er bevor-zugt Diglycin. Als Carbonylkomponenten benutzte er nament-lich Aceton oder cyclische Ketone.

Im Hinblick auf das Ziel der Synthese nichtterminaler Imidazolidinonpeptide war bei vorliegender Arbeit für die Auswahl der Carbonylkomponenten und der Peptide vor allem die - nicht a priori gewährleistete - Aminoacylierbarkeit der erhaltenen N-terminalen 4-Imidazolidinone massgebend.

2.2.1 Wahl der Dipeptide

Bei der Reaktion von Carbonylverbindungen mit Dipeptiden stellte Panetta (3) fest, dass die Seitenketten der Amino-

säuren einen merklichen Einfluss auf die Geschwindigkeit der Kondensationsreaktionen ausüben. Dies wird durch die Erfahrungen von Cardinaux (8) bestätigt. Selbstverständlich ist auch die Isolierbarkeit und die Kristallisationstendenz der Kondensationsprodukte eine Funktion der Peptidstruktur.

Wenn im Peptid $\text{NH}_2\text{-CHR}_1\text{-CONH-CHR}_2\text{-COOR}$ R_1 kleiner ist als R_2 , tritt nach Panetta (9) eine komplexe Mischung auf, aus der das gewünschte Produkt nicht oder nur unter grossen Schwierigkeiten zu isolieren ist. Ist jedoch die Seitenkette der ersten Aminosäure raumerfüllender, so tritt meist nur ein Produkt auf, das im allgemeinen mit geringem Aufwand rein erhalten wird. Voluminöse Seitenketten R_2 sind in der Regel hinderlich. Dass sich diese Aussage nicht generalisieren lässt, zeigt die Reaktion von Aceton mit Glycylphenylalanin, deren Endprodukt leicht zu isolieren ist. Die von Hardcastle (4) beschriebene Reaktion von Aceton mit Ampicillin, die unter äusserst milden Bedingungen verläuft und als einziges Produkt das gut isolierbare Hetacillin liefert, deutet ebenfalls darauf hin, dass der Einfluss der Seitenketten der Aminosäuren nicht überschätzt werden darf.

So zeigen auch unsere Peptidester Phe-Ala-OBut, Phe-Leu-OBut, Phe-Phe-OBut und Phe-Val-OBut keine merkbaren Unterschiede in ihrer Reaktivität gegenüber verschiedenen Carbonylkoponen. Phenylalanin bot sich als N-terminale Aminosäure nicht allein wegen der relativ voluminösen Benzyl-Seitenkette an, sondern auch wegen der NMR-spektroskopischen Möglichkeit zur Erfassung von Wechselwirkungen des Benzolrings mit den Alkylidenprotonen (vgl. Abschnitt 5.1.4).

2.2.2 Wahl der Carbonylkomponente

Die häufige Verwendung von Aceton, Cyclohexanon oder Cyclopentanon (2)(3)(4)(5) ist offensichtlich nicht auf deren besondere Reaktivität zurückzuführen, sondern vielmehr auf Einheitlichkeit der Rohprodukte und dadurch erleichterte Aufarbeitung. Die reaktiveren Aldehyde neigen mit Ausnahme von Formaldehyd (s.u.) zur Bildung von Nebenprodukten, vor allem durch Selbstkondensation, welche die Aufarbeitung beeinträchtigen. Bekannt sind die Imidazolidinone aus Acetaldehyd (8) und Isobutyraldehyd (2)(3), während Benzaldehyd zu Schiff'schen Basen führt.

Panetta (3) untersuchte die Kondensation von Diglycin mit verschiedenen Aldehyden: während Isobutyraldehyd rasch zu einem stabilen und charakterisierbaren Imidazolidinon-peptid reagiert, führt Acetaldehyd in einer heftigen und stark exothermen Reaktion zu einer äußerst komplexen Reaktionsmischung, die allen Versuchen zu ihrer Auftrennung in einzelne Komponenten widerstand. Die mit Benzaldehyd und p-Nitro-benzaldehyd erhaltenen Produkte sind labil. Bei Versuchen zu ihrer Isolierung und Identifizierung zerfielen sie rasch wieder in ihre Ausgangsverbindungen.

Im Gegensatz dazu erhielt Cardinaux (8) in guter Ausbeute N,N'-Alkylidenpeptide aus Peptidestern und Acetaldehyd in wässriger alkoholischer Lösung. Bei Versuchen zur Kondensation mit Aceton zeigten sich aber unerwartete Unterschiede: der Hexapeptidester Val-Tyr-Val-His-Pro-Phe-OME lässt sich in guter Ausbeute zum 2,2-Dimethyl-imidazolidin-4-on-derivat umsetzen. Unter denselben Reaktionsbedingungen entstehen mit Val-His-Pro-Phe-OME keine Imidazolidinon-ähnlichen Produkte. Wird die Reaktionsdauer um ein Vielfaches verlängert, so weist das DC auf das Vorliegen von mindestens fünf verschiedenen Produkten hin, auf

deren Auftrennung Cardinaux verzichtete. Sein Vierer-Peptid Pro-Leu-Glu(OBut)-Phe-OBut wird durch Aceton nicht verändert.

Geringe Kondensations Tendenzen gegenüber Peptiden besitzt nach Cardinaux der Formaldehyd. Bei Versuchen zur Umsetzung verschiedener Peptidester mit Formalin zeigte nur Pro-Leu-Glu(OBut)-Phe-OBut, das mit Aceton überhaupt nicht reagiert hatte, eine Tendenz zur Imidazolidinonbildung. Der oben aufgeführte Hexapeptidester und das Vierer-Peptid liessen keinerlei Produktbildung erkennen. Auf Grund dieser Angaben, aus denen keine allgemeingültigen Regeln für die Wahl der Carbonylkomponenten abgeleitet werden konnten, entschlossen wir uns, verschiedene Aldehyde und Ketone mit dem Dipeptidester Phe-Ala-OBut umzusetzen:

Acetaldehyd reagiert mit dem Dipeptidester in 96% Aethanol oder in Methanol bei Zimmertemperatur zum N,N'-Alkyliden-peptidester, wobei durch Aenderung der Temperatur und des Molverhältnisses der Reaktionspartner die Reaktionsdauer, wie auch die Reinheit des Produktes stark beeinflusst wird. Der Acetaldehyd neigt bei allen möglichen Bedingungen mehr oder weniger stark zur Selbstkondensation. Die dabei auftretenden braunroten Kondensationsprodukte erschweren die Isolierung der gewünschten Imidazolidinone. Auch das Auftreten der zwei möglichen Epimeren am N,N'-Alkyliden-C des 4-Imidazolidinonringes wirkt störend.

Formaldehyd, in gleichem Molverhältnis und unter den gleichen übrigen Bedingungen anstelle von Acetaldehyd eingesetzt, zeigt gute Umsetzung zum N,N'-Methylderivat. Die erforderlichen Temperaturen, die wesentlich höher liegen als bei den Umsetzungen mit Acetaldehyd, sind möglicherweise Ausdruck eines anderen Reaktionsweges (Schiff'sche Base als Primärprodukt) .

Da aber die Tendenz zur Selbstkondensation bei Formaldehyd weit geringer ist als bei Acetaldehyd, sind die erhöhten Temperaturen unproblematisch.

Mit Aceton, in grossem Ueberschuss als Lösungsmittel verwendet, lässt sich Phe-Ala-OBut bei Temperaturen von 50-100°C und Reaktionszeiten von 1-2 h in das 2,2-Dimethyl-4-imidazolidinon überführen. Reaktionsgeschwindigkeit und Ausbeute sind jedoch geringer als bei Formaldehyd.

Cyclohexanon und Cyclopentanon reagieren merklich rascher als Aceton.

Diese Resultate zeigen, dass Formaldehyd und Acetaldehyd als Carbonylverbindungen bei der Herstellung von 4-Imidazolidinonen vermehrter Beachtung bedürfen. Vor allem der Formaldehyd zeigt wesentliche Vorteile gegenüber anderen Carbonylverbindungen. Aehnlich in der Reaktivität wie der Acetaldehyd, übertrifft er diesen beträchtlich hinsichtlich Reinheit und Einheitlichkeit der Rohprodukte. Das Fehlen von Selbstkondensationsprodukten und von Isomeren erleichtert die Aufarbeitung, die kleine Raumerfüllung der Methylengruppe ist auch bei der Aminoacylierung von Vorteil (s.u.).

2.2.3 Reaktionsbedingungen

Die optimalen Reaktionsbedingungen sind bei den einzelnen Carbonylkomponenten sehr verschieden. Entscheidend ist die Wahl des Lösungsmittels, die Menge der zugesetzten Carbonylverbindung, die Temperatur und die Reaktionsdauer. Das Zusammenspiel dieser vier Parameter bestimmt nicht nur die Reinheit des Produktes sondern auch die Möglichkeit und den Aufwand zu dessen Isolierung und Charakterisierung. Die

Dünnschichtchromatographie erlaubt die Ueberprüfung der optimalen Reaktionsbedingungen mit geringen Mengen an Edukten.

Formaldehyd, eingesetzt als wässrige Formalinlösung, reagiert in Methanol oder Aethanol als Lösungsmittel in 2 Stunden bei einer Temperatur von 100°C vollständig zum Methylen-dipeptidester. Ein Molverhältnis des Dipeptidesters zu Formaldehyd von zwei zu eins erweist sich als optimal. Die Reaktionsgeschwindigkeit wird durch den Ueberschuss an Formaldehyd stark erhöht, der Anteil an Selbstkondensationsprodukten von Formaldehyd bleibt aber dennoch relativ gering. Als polares, protisches Lösungsmittel stabilisiert Alkohol z.B. geladene Zwischenprodukte, wie etwa die sehr reaktiven Immoniumionen (vgl. Abschnitt 2.2.5). Ersatz von Methanol bzw. Aethanol durch Chloroform, Methylenchlorid oder Benzol führt zu wesentlich geringerem Umsatz. Alkohole sind also bevorzugte Lösungsmittel und deshalb nicht nur als Verdünnungsmittel zu betrachten.

Formaldehyd reagiert mit dem Peptidester bei Temperaturen von $25-50^{\circ}\text{C}$ langsam. Verlängerte Reaktionszeiten erhöhen dabei zwar die Ausbeute, doch entstehen auch vermehrt Nebenprodukte. Diese Nebenproduktbildung wird von Cardinaux (8) bestätigt. Bei der Reaktion von Val-His-Pro-Phe-OMe mit Aceton zeigte sich nach längerer Zeit zwar keine Produktbildung, doch traten im DC fünf zusätzliche Flecken auf, die nur als Nebenprodukte gedeutet werden können.

Kondensationen mit Acetaldehyd verlaufen auf Grund der grossen Reaktivität unter Schwierigkeiten. Während Cardinaux (8) beim Tetrapeptidester Val-His-Pro-Phe-OMe nach einer Stunde bei 55°C vollständige Umsetzung mit Acetaldehyd in absolutem oder 80% Methanol nachwies und ein gut zu reinigendes Produkt isolierte, erhielt Panetta (3) mit Diglycin eine

komplexe Reaktionsmischung. Unsere Versuche zeigen, dass sich Acetaldehyd (1-4 Aeq.) mit Phe-Ala-OBu in Alkoholen bei 20-80°C in 1-48 h zum gewünschten Produkt umsetzt. Die Reaktionsgeschwindigkeit wird vor allem durch die Temperatur beeinflusst, währenddem die Menge an zugesetzter Carbo-nylkomponente entscheidend die Reinheit des Produktes bestimmt.

In Versuchen mit 20-50 mg Dipeptidester in 2-5 ml Lösungsmittel kann der Umsatz durch DC abgeschätzt werden. Wir finden folgende Ergebnisse:

- In Alkohol als Lösungsmittel kondensiert Acetaldehyd mit Phe-Ala-OBu bei 80°C in einer Stunde vollständig zum gewünschten 4-Imidazolidinon. Bei tieferen Reaktions-temperaturen verlängert sich die Reaktionszeit. Bei 25°C finden wir nach zwei Stunden erst Spuren des gewünschten Produktes; bis zur Vollständigkeit vergehen ca. 3 Tage.
- Die Reaktionsgeschwindigkeit wird zusätzlich, aber weniger stark, durch die Grösse des Acetaldehydüberschusses beeinflusst. Ueberschüssiger Acetaldehyd bewirkt jedoch ein starkes Ansteigen von Selbstkondensationsprodukten. Dieser letztere Effekt ist nur unwesentlich temperaturabhängig.
- Der Zusatz von wasserentziehenden Mitteln (Molekularsieb, Magnesiumsulfat) beeinflusst die Geschwindigkeit der Produktbildung nur unmerklich.
- Diäthylacetal anstelle von Acetaldehyd geht mit dem Dipeptidester keine Reaktion ein.
- Die optimalen Reaktionsbedingungen ändern sich mit dem verwendeten Ausgangspeptid. Generell scheint Alkohol als Lösungsmittel, eine Temperatur von 25°C und 10-100 % Acetaldehyd-Ueberschuss bei einer Reaktionsdauer von bis

zu fünf Tagen optimal zu sein.

Cyclohexanon, direkt als Lösungsmittel verwendet, setzt sich mit Phe-Ala-OBu schon bei Zimmertemperatur um. Vollständigkeit der Reaktion kann aber nur durch Erwärmen erreicht werden, wobei bei 100°C die Reaktionszeit eine bis zwei Stunden beträgt, das Produkt einheitlich und die Umsetzung vollständig ist.

2.2.4 Aufarbeitung und Reinigung der Rohprodukte

Die Rohprodukte, die aus der Reaktionslösung durch Eindampfen gewonnen werden, sind laut DC in bezug auf das Produkt einheitlich. Sie sind aber meist stark mit Selbstkondensationsprodukten der Carbonylverbindungen verunreinigt, sodass eine direkte Kristallisation unmöglich ist. Einzig das Cyclohexanonderivat lässt sich direkt aus einem Gemisch von Essigester und n-Hexan kristallisieren, wobei aber die Ausbeute bei mehrmaligem Umkristallisieren klein wird. Zumeist müssen aufwendigere Reinigungsmethoden - Säulen- oder Dickschichtchromatographie - verwendet werden. Doch auch ihrer Anwendung sind durch die Eigenschaften der 4-Imidazolidinone Grenzen gesetzt. Im Gegensatz zu der Stabilität, die Davis (1) und du Vigneaud (5) bei ihren 4-Imidazolidinonderivaten feststellten, zeigen unsere **M,N'**-Alkyliden-derivate von Phe-Ala-OBu eine merkliche Zerfallstendenz in organischen Lösungsmitteln. Analog zu ihrer Bildung im Zuge einer Gleichgewichtsreaktion zerfallen sie in Lösung langsam wieder in ihre Komponenten, wenn man sie nach der Isolierung in gelöstem Zustand aufbewahrt.

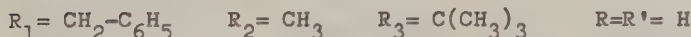
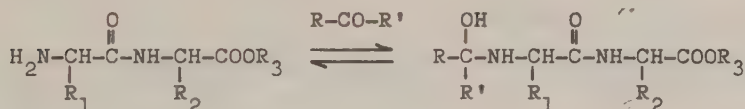
Gerade die Selbstkondensationsprodukte der Carbonylkomponenten, die die stärkste Verunreinigung der gewünschten Produkte ausmachen und bevorzugt abgetrennt werden sollten,

begünstigen massgeblich diesen Zerfall. Die Zerfallstendenz, die ausserdem vom Lösungsmittel abhängig ist und durch Spuren von Wasser verstärkt wird, beschränkt den Einsatz der oben erwähnten Reinigungsverfahren zumeist auf die stabileren Cyclohexanonderivate, während Acetaldehyd- und Formaldehydderivate in Form der freien Basen nur in ungenügender Reinheit erhalten werden.

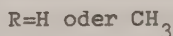
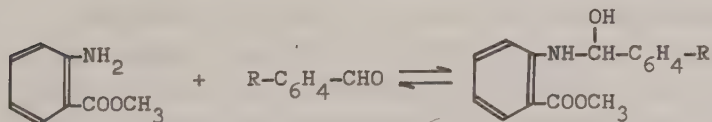
Nun zeigt sich, dass N,N'-Alkylidenpeptidester als Hydrochloride wesentlich stabiler sind. Diese erhöhte Stabilität ermöglicht die Reindarstellung der Imidazolidinonpeptide als Hydrochloride: die N,N'-Alkylidenpeptidester werden nach intensiver Trocknung am Hochvakuum in trockenem Aether gelöst und entweder durch Einleiten von HCl-Gas, besser noch durch Zugabe von ein bis zwei Äquivalenten HCl in Aether, als Hydrochloride gefällt. Geringe Mengen an Selbstkondensationsprodukten der Carbonylverbindungen sind ohne Einfluss auf die Hydrochloridfällung. Erst stärkere Verunreinigungen vermindern die erwartete Ausbeute. Die Hydrochloride lassen sich aus Methanol-Aether oder n-Propanol-Aether gut umkristallisieren und zeigen in getrocknetem Zustand keinerlei Zersetzungstendenzen. Durch Neutralisation mit Triäthylamin und Extraktion in Aether lassen sich die freien Imidazolidinonpeptide wieder zurückgewinnen. Sie zeigen keinerlei Unterschiede gegenüber den ursprünglichen Derivaten, weder in ihrem DC-Verhalten noch in ihren chemischen Eigenschaften. Die Methylen- und Äthylidenderivate können aber auch nach dieser Reinigung via Salzbildung nur als Öle erhalten werden. Versuche zur Kristallisation aus verschiedenen Lösungsmitteln blieben erfolglos. Die Salzbildung erweist sich somit nicht nur als gute Reinigungsmethode; sie ist vielmehr die einzige Möglichkeit, N,N'-Alkylidenpeptide längere Zeit aufzubewahren.

2.2.5 Diskussion des Reaktionsverlaufes

Die Herstellung von N,N'-Alkylidenpeptiden wird bestimmt durch die Reaktionsmöglichkeiten zwischen Peptiden und Carbonylverbindungen. Anhand der Reaktion des Peptidesters Phe-Ala-OBut mit Formaldehyd lassen sich verschiedene Reaktionsschritte und Zwischenprodukte formulieren, die möglicherweise am Reaktionsablauf beteiligt sind. Im Hinblick auf den Basizitätsunterschied zwischen Amino- und Peptid-Stickstoff dürfte die Reaktion mit der Carbonylkomponente an der Aminogruppe einsetzen, und zwar unter reversibler Bildung eines α -Aminocarbinols:

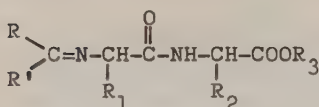


Dies ist der fundamentale Schritt aller Amin-Carbonyl-Reaktionen. Smith (14) konnte bei der Umsetzung von Anthranilsäuremethylester mit Benzaldehyd und p-Methylbenzaldehyd die entsprechenden α -Aminocarbinole isolieren:

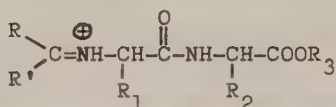


Nach Ogata (15) wird die Gleichgewichtslage der α -Aminocarbinolbildung weitgehend durch elektronische und sterische Substituenten-Einflüsse bestimmt. Die Reaktion unterliegt zudem der allgemeinen Säure-Basenkatalyse; Carbonylgruppen können durch Säure, Amine durch Basen aktiviert werden.

α -Aminocarbinole sind im allgemeinen sehr instabil. Ihre Isolierung gelingt deshalb nur in besonders günstigen Fällen (s.o.). Meistens reagieren sie weiter. So können durch intramolekulare Wasserabspaltung Schiff'sche Basen oder Immoniumionen entstehen:



Schiff'sche Base



Immoniumion

Die Reaktivität der letzteren dürfte gegenüber nucleophilen Reagenzien höher sein als die der entsprechenden α -Aminocarbinole.

Schiff'sche Basen reagieren mit diversen Nucleophilen und Immoniumderivate sind zweifellos noch weit reaktiver. Als massgebend für die schliessliche Imidazolidinonbildung erscheint somit neben der thermodynamischen Stabilität die Bildungsgeschwindigkeit der Immoniumform und die Aktivierungsenergie der Cyclisierungsreaktion verglichen mit den Aktivierungsenergien anderer Folgereaktionen. Konformative Einflüsse werden die Ringschlusstendenz mitbestimmen. Auch können bei längeren Peptidketten bestimmte Ueberstrukturen

1.2 Chemische Eigenschaften der terminalen Imidazolidinone

Die chemischen Eigenschaften einfacher +imidazolidinone wie auch der komplizierteren terminalen N,N'-Alkyliden-Verbindungen sind bereits durch mehrere Autoren - Davis (1), Dobson (2), Farnett (3), Harwood (4), de Vignaud (5) sowie Cardon (6) - beschrieben worden. Deshalb sollen an dieser Stelle vor allem diejenigen Eigenschaften diskutiert werden, die für die weiteren Untersuchungen an nichtterminalen Imidazolidinon-Verbindungen von Bedeutung sind.

1.2.1 Salinität und Reaktivität - Solvolysereaktionen

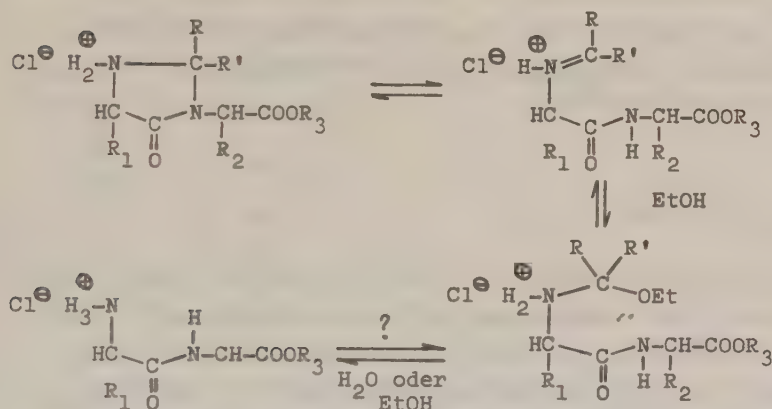
1.2.1.1 Imidazolidinonhydrolyse

Bei Salinitätsbestimmungen dienen die Hydrolyse selbst nach längerem Zeit bei 100°C angeschlossen. In Lösung jedoch zerfallen sie sich in bestimmten Lösungsmitteln langsam und in D₂ finden sie nach nur wenigen Zeitstücken das Ausgangselektrolyt. Auf Grund der in geringen Löslichkeit in vielen organischen Lösungsmitteln mußte sich die Untersuchung dieser Zerfallreaktion auf wenige Lösungsmittel beschränken.

Dabei zeigte sich, dass N,N'-Alkyliden-Verbindungen in organischen Lösungsmitteln unverändert stehen, selbst im Methanol, Ethanol oder Dimethylsulfoxid zerfallen sie nach Tagen nur geringe Mengen an Ausgangselektrolyt, welche auf die in den Lösungsmitteln vorhandenen geringen Mengen an Wasser zurückzuführen sind.

In aprotischen Lösungsmitteln wie Methanol, Acetonol und 1,2-Dichloroethan - höhere Alkohole lösen in geringer - Menge

liegen N,N'-Alkylidenpeptide der Solvolyse, wobei als Zwischenprodukte α -Aminoäther denkbar sind:



Untersuchungen an $\text{Cl}^\ominus \text{H}_2\text{N}^+ \text{Phe} \text{---} \text{Ala} \text{---} \text{OBut}$ zeigten, dass die Geschwindigkeit der Solvolyse von diversen Faktoren - Lösungsmittel, Alkylidengruppe, Temperatur - abhängt. So zeigen sich in der Reihe der Alkohole geringe aber doch merkbare Unterschiede, indem i-Propanol die Rückreaktion zum Ausgangspeptid weniger stark begünstigt als Aethanol oder gar Methanol. i-Propanol ist bei mehrfachem Umkristallisieren von Imidazolidinon-Hydrochloriden dem Methanol vorzuziehen. Ebenfalls beim Umkristallisieren macht sich der Temperaturfaktor bemerkbar. Während die Solvolysereaktion bei Temperaturen bis zu 10°C unmerklich bleibt, nimmt schon oberhalb 20°C der Dipeptidester stetig zu. Mit Ausnahme der Formaldehydderivate scheinen Imidazolidinone aus Aldehyden stärker der alkoholischen Solvolyse zu unterliegen als solche aus Ketonen; die Methylenderivate sind ausserordentlich stabil (vgl. Abschnitt 2.3.3).

2.3.1.2 Freie Imidazolidinone

Sie verhalten sich in Lösung wie die Hydrochloride, wobei aber der Zerfall rascher erfolgt. Als Öle sind sie auf Grund der Verunreinigung mit Selbstkondensationsprodukten der Carbonylverbindungen und Restlösungsmitteln nur beschränkte Zeit haltbar.

2.3.2 Hydrolyse

N,N'-Alkylidenpeptide unterliegen in wässriger Lösung der Hydrolyse. Als Hydrolyseprodukte treten Ausgangspeptid und Carbonylverbindung auf. Die Hydrolysegeschwindigkeit ist abhängig vom pH der wässrigen Lösung und wird weiter beeinflusst durch die Substituenten am Imidazolidinonring sowie durch die Peptidsequenz.

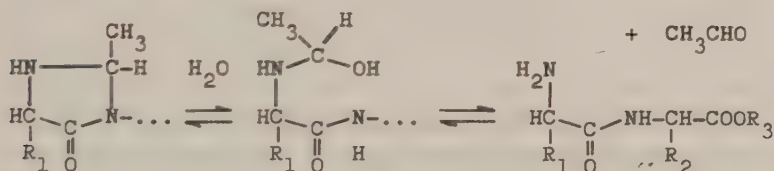
pH-Abhängigkeit

Cardinaux (8) prüfte qualitativ die Abhängigkeit der Hydrolysegeschwindigkeit vom pH am Beispiel des N,N'-Aethylidenderivats $\begin{matrix} | \text{CHR} | \\ \text{Val-Tyr-Val-His-Pro-Phe-OMe} \end{matrix}$ ($\text{R}=\text{CH}_3$). Dabei fand er ein Maximum bei pH 6,5; unterhalb pH 3,5 nimmt die Hydrolysetendenz stark ab und auch im basischen Bereich ist sie weit geringer als bei neutralem pH. Das Aethylidenderivat wird durch Wasser bei Zimmertemperatur nur langsam, bei 100°C in 60 Min. vollständig hydrolysiert. Aceton-Oxytocin und Hetacillin zeigen ähnliche Eigenschaften.

In Übereinstimmung mit Cardinaux finden wir für unser Aethylidenderivat $\begin{matrix} | \text{CHR} | \\ \text{Phe-Ala-OBu}^t \end{matrix}$ ($\text{R}=\text{CH}_3$) die größte Hydrolyseempfindlichkeit im Bereich von pH 6-7,5, unabhängig von der

Temperatur. Bei pH 7 und 90°C ist die Hydrolyse nach 1 h vollständig, sofern das Edukt-Produkt-Gleichgewicht, beispielsweise durch Entfernen der Carbonylkomponente mittels azeotroper Destillation, gestört wird.

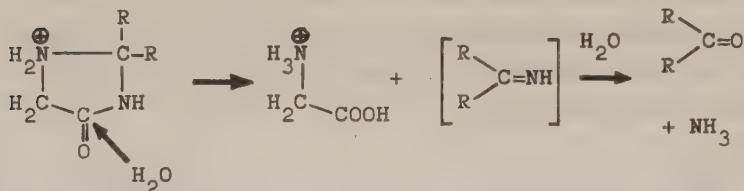
Als einziges Hydrolyseprodukt findet sich im DC der Dipeptid-ester. Die Hydrolyse lässt sich als Umkehrung des Kondensationsschrittes formulieren:



Die Hydrolysebeständigkeit im Bereich von pH 1-3 ist auch hier weit grösser. Zusätzlich zum Dipeptidester findet man im DC zwei weitere Hydrolyseprodukte (s.u.). Nach vollständiger Hydrolyse bei pH 1 und quantitativer Auswertung lässt sich deren Anteil auf ungefähr 40 % schätzen. Bei höheren pH-Werten treten diese zusätzlichen Produkte zugunsten des erwarteten Dipeptidesters zurück.

Eine mögliche Erklärung für dieses Hydrolyseverhalten findet sich bei Zehavi (2). Bei der Hydrolyse einfacher 4-Imidazolidinone erstaunte ihn deren grosse Beständigkeit im sauren Bereich und der rasche Zerfall bei pH 7. Zudem isolierte er bei saurer Hydrolyse aus 2-Phenyl-4-imidazolidinon und 2-Spirocyclohexano-4-imidazolidinon stets nur Glycin; zu keiner Zeit der sauren Hydrolyse konnte er Glycinamid als Hydrolyseprodukt feststellen. Bei pH 7 dagegen war das Hydrolyseprodukt stets Glycinamid. Daraus schloss Zehavi, dass die Hydrolyse sauer anders

verlaufe als neutral. Er postulierte für den ersteren Fall einen Angriff des protonierten Imidazolidinonrings durch Wasser am Carbonyl-C



und für den letzteren Fall eine Zerfallsreaktion am Kohlenstoff der Carbonylverbindung mit Abspaltung von Glycinamid.

Die zwei zusätzlichen Hydrolyseprodukte unserer Reaktion bestätigen Zehavis Beobachtungen. Im DC lassen sie sich eindeutig als Phenylalanin und Alanin-t-Butylester identifizieren. Das Auftreten dreier zusätzlicher Produkte bei längerer Hydrolysedauer ist die Folge einer Spaltung des t-Butylesters zu Alanin.

Mit steigendem pH wird dieser Hydrolysemechanismus zugunsten der Umkehrung des Kondensationsschrittes verdrängt. Schon bei pH 3 lassen sich weder Phenylalanin noch Alanin-t-Butylester feststellen.

Temperaturabhängigkeit

Die Hydrolysegeschwindigkeit ist sehr stark von der Temperatur abhängig. Währenddem bei ZT das Aethylidenderivat von Phe-Ala-OBut nach 1 h in Aethanol-Wasser-Gemischen erst ca. 10 % Dipeptidester enthält (DC) und erst nach Tagen vollständig hydrolysiert ist, tritt bei 60°C schon nach 1 h mehrheitlich der Dipeptidester auf, und bei 100°C ist die Hydrolyse nach 60 Min. vollständig.

Einfluss der Substituenten

Neben dem pH und der Temperatur sind die Substituenten am Imidazolidinonring weitgehend mitbestimmend für die Hydrolysegeschwindigkeit. Substitution in 5-Stellung sollte sich erwartungsgemäss bei saurer Hydrolyse (Amidspaltung), Substitution in 2-Stellung bei neutraler und alkalischer Hydrolyse (Umkehrung des Kondensationsschrittes) auswirken. Das Experiment bestätigt diese Erwartung.

Einerseits unterscheiden sich das 2-Phenyl- resp. 2-Spiro-cyclohexano-4-imidazolidinon nach Zehavi (2) vom 2-(4-Nitro-Phenyl)-derivat sofern, als das Glycinamid aus ersterem in kochender wässriger Lösung oder in kalter alkalischer Lösung entsteht, während unter den gleichen Bedingungen das letztere nur langsam zu Glycinamid gespalten wird. Andererseits beobachtete Davis (1) noch nach 100 stg. Behandlung von 2,2-Dimethyl-4-imidazolidinon mit 5 N HCl bei ZT unverändertes Ausgangsmaterial, während das 5-Phenyl-derivat schon nach 24 h nicht mehr nachweisbar war.

Wir haben qualitativ den Einfluss der Substituenten in 2-Stellung des Imidazolidinonrings auf die Umkehrreaktion des Kondensationsschrittes untersucht, und zwar anhand des Methylen-, Aethyliden- und Cyclohexylidenderivats von Phe-Ala-OBu^t. Das Aethylidenderivat zerfällt wässrig-neutral unabhängig vom Alkoholgehalt (10-90 %) und der Temperatur (20-80°C) am raschesten. Sein Verhalten entspricht etwa demjenigen der Aethylidenderivate von Cardinaux und der Isopropylidenderivate von du Vigneaud (5) und Hardcastle (4).

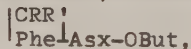
Das Cyclohexylidenderivat ist weit beständiger. Eine totale Hydrolyse zum Dipeptidester dauert in kochenden Aethanol-Wasser-Gemischen bis zu 4 h; bei ZT ist die Zerfalls-

geschwindigkeit so gering, dass selbst nach Tagen noch unverändertes Imidazolidinon zu finden ist. Diese aussergewöhnliche Stabilität wird von Ariyoshi (10) am Cyclohexylidenderivat von Asp-Phe-OMe bestätigt.

Am hydrolysebeständigsten erweist sich das Methylen-derivat. Selbst bei 90°C in Alkohol-Wasser ist die Hydrolyse äusserst langsam: nach 4 h finden sich im DC nur geringe Anteile an Dipeptidester. In Uebereinstimmung mit Cardinaux (8) finden wir, dass sich Methylen-derivate erst unter den drastischen Bedingungen der sauren Hydrolyse zersetzen. Zweistündiges Kochen bewirkt einen langsamen Zerfall, wobei erwartungsgemäss neben dem Dipeptidester Phenylalanin und Alanin-t-Butylester auftreten.

Einfluss der Peptidsequenz: distaler Substituenten-Effekt

Ein Vergleich des Hydrolyseverhaltens von N,N'-Alkyliden-derivaten verschiedener Peptidester



Asx = Ala, Val, Phe resp. Leu, zeigt nur minime Unterschiede, aus denen sich keine Gesetzmässigkeit ableiten lässt.

2.3.3 Basizität der N,N'-Alkylidenpeptide

Titrationsskurven von N,N'-Alkylidenpeptiden zeigen, dass deren Basizität wesentlich kleiner ist als jene der unverbrückten Ausgangs-peptide. Während Titrationen von Phe-Ala-OBut in Eisessig resp. 60-proz. Dioxan und der Hydrolysegrad des Hydrochlorids in Wasser ein Puffergebiet im pH-Bereich von 8-10 erkennen lassen, verschiebt sich dieses Puffergebiet bei den N,N'-Alkylidendi-peptidestern

in den Bereich von pH 2,5-4. Es lassen sich die folgenden scheinbaren pK_a -Werte ermitteln:

Peptide	Hydrochlorid in Wasser 1)	60% Dioxan/ Wasser 2)	Eisessig 3)
Phe-Ala-OBut	8,1	7,9	
$\left\{ \begin{array}{l} \text{CRR} \\ \text{Phe} \end{array} \right\} \text{Ala-OBut}$			
a) $R=R'=H$	3,6	3,3	3,1
b) $R=H, R'=CH_3$	3,9	3,6	3,8
c) $RR'=(CH_2)_5$	3,7	3,4	3,4

- 1) $pK_a = 2pH + \log(c_o - H^+)$, wobei c_o = Konzentration des Imidazolidinonpeptids in Mol/l (vgl. Abschnitt 7.6.1)
- 2) Titration mit $HClO_4$ bis zum Halbtitrationspunkt
 $pK^{(H_2O)} = pK^{(LM)} + \log y_o$, wobei für 60% Dioxan-Wasser gilt: $\log y_o = 1$, (16) (vgl. Abschnitt 7.6.2)
- 3) Titration in Eisessig mit $HClO_4$, (17). Referenzsubstanz: m-Chloranilin $pK_a^{(H_2O)} = 3,6$ (vgl. Abschnitt 7.6.3)

Eine Begründung für die grossen Basizitätsdifferenzen von ca. 4,5 pK-Einheiten zwischen Imidazolidinonpeptiden und Dipeptidester ist bei den Faktoren zu suchen, welche allgemein für die Basizität von Aminen verantwortlich sind: die Solvation des freienamins resp. der Ammoniumform in Abhängigkeit von Struktur und elektronische Effekte. Eine vergleichende Betrachtung ausgewählter Beispiele zeigt, dass sterische Effekte der Substituenten am Stickstoff (N-1) - Hinderung der Protonierung desamins sowie der Solvation der Ammoniumform - den pK_a -Wert von Aminen

nur wenig beeinflussen; man vergleiche verschiedene N-Alkyl-Aminosäuren (18):

Glycin	$pK_a = 9,6$	Prolin	$pK_a = 10,6$
N-Methyl-glycin	10,0		
N,N-Dimethyl-glycin	9,9		

Von weitaus grösserem Einfluss auf die Basizität sind dagegen induktive- und mesomere Effekte. Nach Clark (19) bewirken polare Substituenten am Nachbar-C des basischen Zentrums pK_a -Änderungen von bis zu 5,8 pH-Einheiten, und selbst in β -Stellung zum Stickstoffatom lassen sich basizitätsvermindernde Effekte von bis zu 3,6 pH-Einheiten feststellen:

Substituenten	ΔpK_a	
	α -Stellung	β -Stellung
Phenyl	1,4	0,8
Cyanid	5,8	3,0
COR		1,6
NHR, NR ₂	1,7	0,9
NH ₃ ⁺ , NR ₃ ⁺		3,6
CONH ₂	2,8	1,1

Diese ΔpK_a -Werte von Clark, die auf Grund einer Gleichung von Hall (20) und Taft(21) für aliphatische, alicyclische und heterocyclische Amine errechnet wurden, erlauben die Abschätzung der Basizität von Aminen, unter alleiniger Berücksichtigung der polaren Strukturelemente.

Auf N,N'-Alkylidenpeptide angewandt, lässt diese Betrachtungsweise folgendes erwarten:

Grundwert für ein sek. cycl. Amin	$pK_a = 11,3$
ΔpK für: $CONH_2$ am α -C des Amins	- 2,8
NH-CO-R am α -C des Amins	- 3,3
Phenyl am β -C des Amins	- 0,8
	$pK_a = 4,4$

Setzt man für gehinderte Solvatisierung (s.o.) einen ungefähren Wert von $pK = 0,5$ ein, so resultiert mit der Schätzung von $pK_a = 3,9$ eine gute Uebereinstimmung mit den gemessenen Werten.

2.3.4 Acylierbarkeit der N,N'-Alkylidenpeptide

Acylierungen von 4-Imidazolidinonen finden in der Literatur nur sporadisch Erwähnung. Davis (1) erhielt aus dem 2,2-Dimethyl- und dem 2,2-Dimethyl-5-phenyl-4-imidazolidinon mit Essigsäureanhydrid ein monoacetyliertes Derivat, während Edward (22) aus 5,5-Diphenyl-4-imidazolidinon mit Essigsäureanhydrid, Propionsäureanhydrid oder Benzoylchlorid durchwegs die 1,3-Diacylverbindungen isolierte. Ferrini (23) erhielt bei der Reaktion von Ac_2O in Pyridin mit 2,2,5,5-Tetramethyl-4-imidazolidinon bei ZT das 1-Acyl-derivat. Wurde die Acylierung jedoch in der Wärme durchgeführt, so entstand ein Gemisch an Reaktionsprodukten. Durch fraktionierte Kristallisation liess sich daraus als Hauptprodukt wiederum das 1-Acetylderivat gewinnen; beim

Nebenprodukt handelte es sich wahrscheinlich um ein Diacetylderivat.

Einzigste Acylierungsversuche an Peptidimidazolidinonen finden sich bei Cardinaux (8). Umsetzungen von $\text{Val}^{\text{CHR}}\text{-His-Pro-Phe-OMe}$ ($\text{R}=\text{CH}_3$) mit Ac_2O in Methanol oder Pyridin ergaben durchwegs Gemische. Dabei liess sich nicht eindeutig feststellen, ob die Acetylierung am endständigen Valin oder am Histidin-Rest oder anbeiden erfolgte. Versuche zur Einführung der Carboxybenzoxygruppe zeitigten die gleichen Ergebnisse.

Bei unseren Versuchen, die N,N'-Alkylidenpeptide $\text{Phe}^{\text{CRR}}\text{-Ala-OBut}$ a) $\text{R}=\text{R}'=\text{H}$ b) $\text{R}=\text{H}$, $\text{R}'=\text{CH}_3$ c) $\text{R},\text{R}'=(\text{CH}_2)_5$ und den unverbrückten Dipeptidester Phe-Ala-OBut zu acylieren, erhielten wir eindeutig charakterisierte Produkte. Es zeigte sich, dass die Methylen- und Äthylidenpeptide mit Essigsäureanhydrid oder Benzoylchlorid oder Carboxybenzoylchlorid schnell und praktisch quantitativ acyliert werden, während das Cyclohexylidenderivat mit keinem der drei Acylierungsmittel reagierte.

2.3.4.1 Acylierungen mit Essigsäureanhydrid u. Benzoylchlorid

Werden die Imidazolidinone a) und b) (s.o.) und der Dipeptidester mit $\text{Ac}_2\text{O} - \text{MeOH}$ 1:4 resp. $\text{Ac}_2\text{O} - \text{Pyridin}$ 1:1 umgesetzt, so zeigt das DC nach 1-2 stg. Reaktion ein jeweils unpolares Produkt, das mittels Massenspektrometrie, IR und chromatographischem Verhalten als 1-Acetylderivat charakterisiert wurde. Diese Umsetzung verläuft quantitativ. Die Acylierungen mit Benzoylchlorid in abs. Toluol bei ZT führen bei einer Reaktionsdauer von 2-4 h ebenfalls zu den 1-Acylderivaten. Wie zu erwarten ist, zeigt der Dipeptidester gegenüber den

verbrückten Analoga eine grössere Reaktionsgeschwindigkeit. Phe-Ala-OBut setzt sich mit Benzoylchlorid in Toluol bei ZT in 1 h zum benzoilierten Produkt um. Mit dem reaktiveren Ac_2O ist die Umsetzung sogar schon nach 30 Min. vollständig. Ebenfalls kurze Reaktionszeiten (1-2 h) benötigt das Methylen-derivat, während das Aethylidenderivat nur bei 50-70°C in 2 h vollständig umgesetzt ist, bei ZT aber zwischen 3-4 h benötigt.

Der Unterschied in der Reaktivität zwischen dem Methylen-derivat und dem Dipeptidester ist qualitativ auf Grund der erheblichen Basizitätsdifferenz verständlich, sollte aber, wäre dies die Hauptursache, viel grösser sein. Der Reaktivitätsunterschied zwischen dem Methylen- resp. Aethyliden-derivat bei annähernd gleicher Basizität deutet aber an, dass die sterischen Verhältnisse am Alkyliden-C wesentlich mitspielen. Diese Interpretation bestätigt sich durch die Erfahrung mit dem Cyclohexylidenprodukt. Dieses Alkyliden-derivat lässt sich weder mit Benzoylchlorid noch mit Essigsäureanhydrid unter mehrfach veränderten Bedingungen in das 1-Acylderivat überführen. Selbst bei Temperaturen von 110°C (siedendes Toluol) blieb das Imidazolidinon unverändert. Der Grund dafür dürfte ausschliesslich bei der Raumbeanspruchung durch die voluminöse Cyclohexylidengruppe liegen.

2.3.4.2 Acylierung mit Carbobenzoxychlorid

Analog zu den Umsetzungen von a) und b) und dem Dipeptidester mit Ac_2O und Benzoylchlorid, erhält man mit Z-Cl als Acylierungsmittel wiederum eine 1-Acyilverbindung, die sich jedoch von den acetylierten und benzoilierten Produkten dadurch unterscheidet, dass sich die eingeführte Z-Gruppe

unter peptidchemischen Bedingungen wieder abspalten lässt. Durch Hydrierung mit H_2 und Pd/C als Katalysator erhält man die freien 4-Imidazolidinone unverändert zurück.

Die zur Acylierung mit Z-Cl erforderlichen Bedingungen lassen sich am ehesten mit den milden Bedingungen der Peptidkupplungen vergleichen, sodass die Synthese nicht-terminaler aus terminal überbrückten Peptid-Imidazolidinonen möglich erscheint.

3. NICHTTERMINALE N,N'-ALKYLIDENPEPTIDE

3.1 Synthese nichtterminaler Peptidimidazolidinone

Kupplungen am Aminostickstoff von terminalen N,N'-Alkylidenpeptidestern mit carboxylaktivierten Aminosäurederivaten führen zu den entsprechenden nichtterminalen N,N'-Alkylidenpeptid-Derivaten. Im Reaktionsablauf werden sich die geringe Basizität und die spezielle sterische Situation bei den terminalen Imidazolidinonpeptiden im Sinne einer Erschwerung der Umsetzung bemerkbar machen. Selbst zwischen einzelnen terminalen N,N'-Alkylidenpeptidestern treten beträchtliche Unterschiede in der Reaktivität gegen ein gegebenes Acylierungsmittel auf. Bei den in der Peptidchemie gebräuchlichen speziell milden Synthesebedingungen werden diese Unterschiede besonders deutlich. Wo soviel Wechselwirkung in Erscheinung tritt, kann es nicht erstaunen, dass auch der Struktur der Acylkomponente (N-geschützte carboxylaktivierte Aminosäure) hier eine grössere Rolle als im Normalfall der Peptidsynthese zukommt.

Es galt deshalb, Kupplungsmethoden zu finden, welche diesen Besonderheiten Rechnung tragen. Auf Grund der Vielfalt möglicher Amino- und Carboxylkomponenten erscheint es allerdings kaum möglich, eine allgemein anwendbare Kupplungsmethode anzugeben. Man muss sich vorläufig darauf beschränken, eine gewählte Methode optimal auf die beiden Reaktionspartner abzustimmen.

Wegen der geringen Reaktivität der Aminokomponente kommen vor allem Kupplungsmethoden mit möglichst starker Carboxylaktivierung in Betracht.

Es werden deshalb bei unseren Umsetzungen die folgenden Methoden verwendet:

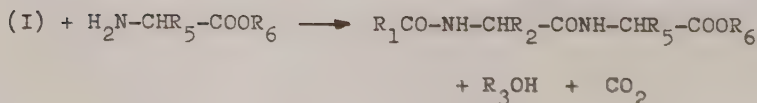
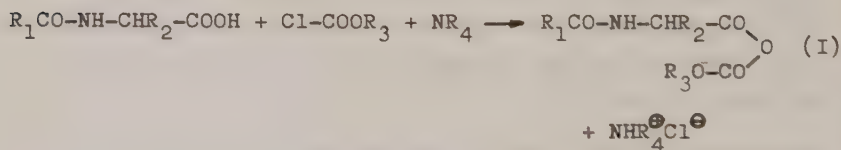
- Gemischte Anhydride mit Chlorameisensäureisobutylester nach Tilak (24)
- Dicyclohexylcarbodiimid nach Sheehan (25)
- 2-Pyridyl-thiolester nach Young (26)

Anhand der Umsetzungen der Methylen-, Aethyliden und Cyclohexylidenderivate von $\begin{array}{c} \text{CRR}' \\ | \\ \text{Phe-Ala-OBut} \end{array}$ mit verschiedenen carboxylaktivierten Aminosäuren wird nachstehend diskutiert: die Wahl der Kupplungsmethode, der entsprechende Reaktionsverlauf, die Nebenproduktbildung, die Ausbeute und die Reinheit der Produkte.

3.2 Acylierungen der Methylenimidazolidinone

3.2.1 Kupplungen unter Verwendung gemischter Kohlensäureanhydriden

Die Verwendung von Alkylchloroformiaten zur Knüpfung von Peptidbindungen wurde 1951 von Wieland (27), Boissonnas (28) und Vaughan (29) gleichzeitig vorgeschlagen.



Auf Grund ihrer Vorteile - schnelle Umsetzung bei guten Ausbeuten und relativ grosser Reinheit der Produkte - fand sie rasch Eingang in die Peptidchemie. Bedeutsamster Umstand ist, dass die unvermeidlichen Nebenprodukte der Kupplungsreaktion - niedriger aliphatischer Alkohol und CO_2 - flüchtig sind und deshalb keinen Abtrennungsaufwand erfordern. Die hohe Reaktivität der gemischten Carbonsäure-Kohlensäure-Anhydride ("Ueberaktivierung") ermöglicht leider auch Nebenreaktionen wie Urethanbildung, Racemisierung und Backbone-Acylierung. Eine Uebersicht findet sich bei Albertson(30), während Anderson (31) sich vor allem mit den Racemisierungsproblemen befasst hat. Manche dieser Nebenreaktionen können durch eine geeignete Wahl der Reaktionsbedingungen vermieden werden, während andere bei gewissen Kombinationen von Reaktionspartnern unvermeidlich sind. Dies zeigt sich auch bei der Aminoacylierung von Imidazolidinon-Peptiden.

3.2.1.1 Acylierungen mit Z-Gly

Zur Acylierung der N,N'-Methylenpeptidester mit Z-Gly und Chlorameisensäure-i-butylester nach der Methode von Tilak (24) wurde das gemischte Anhydrid im Ueberschuss (50% bezogen auf die Aninokomponente) eingesetzt, um eine möglichst vollständige Umsetzung der Aminokomponente zu erzielen.

Das Anhydrid wird in DMF als Lösungsmittel bei einer Temperatur von -15°C und N-Methyl-morpholin als Base hergestellt. Nach einer Reaktionszeit von 12 Min. wird die Aminokomponente zugegeben und der Verlauf der Kupplungsreaktion mittels DC verfolgt. Der unterschiedlichen Reaktivität der Methylen-, Aethyliden- resp. Cyclohexylidenpeptidester wird durch geänderte Temperaturen und Reaktionszeiten Rechnung getragen.

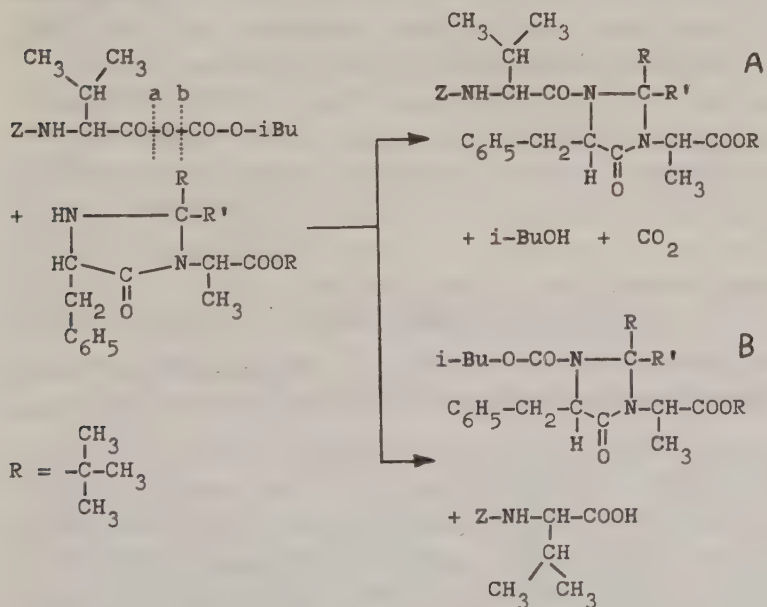
Alle Methylenderivate der verschiedenen Dipeptidester zeigen bei den Umsetzungen mit Z-Gly ihre guten Kupplungseigenschaften. Trotz verminderter Basizität lassen sie sich unter denselben Bedingungen zu Tripeptid-Derivaten umsetzen wie die analogen unverbrückten Dipeptidester. Bei einer Kupplungstemperatur von -15°C und Reaktionszeiten zwischen 4 und 24 h werden Rohausbeuten bis zu 99% erzielt; nach zweimaligem Umkristallisieren aus Essigester-Petroläther erhält man die gewünschten nichtterminalen N,N'-Methylenpeptidester in über 80% Ausbeute:

Peptid	Reakt. zeit	Ausbeute		mp.
		roh	nach Umkrist.	
Z-Gly- $\begin{array}{c} \text{CHH} \\ \text{Phe} \end{array}$ -Ala-OBut	4 h 16 24	98 % 97 98	85 % 85 83	153-154 ^o 153-155 153-155
Z-Gly- $\begin{array}{c} \text{CHH} \\ \text{Phe} \end{array}$ -Val-OBut	4 24	94 95	82 86	165-167 165-166
Z-Gly- $\begin{array}{c} \text{CHH} \\ \text{Phe} \end{array}$ -Phe-OBut	24	98	82	140-141
Z-Gly- $\begin{array}{c} \text{CHH} \\ \text{Phe} \end{array}$ -Leu-OBut	24	94	85	156-157

Auch bei den aufgeführten Reaktionszeiten von 24 h zeigt das DC die Vollständigkeit der Reaktion bereits nach 2-4 h. Nebenprodukte sind nirgends festzustellen. Zur Aufarbeitung wird der Ueberschuss des gemischten Anhydrids mit wässrigem KHCO_3 zerstört. Nach Aufnehmen in Essigester wird mit KHCO_3 , Wasser, KHCO_3 , Wasser, 2N HCl und Kochsalzlösung ausgeschüttelt. Die organische Phase wird nach dem Trocknen mit Natriumsulfat eingedampft. Die Rohprodukte sind nach DC einheitlich und zeigen nur einen unwesentlich tieferen Schmelzpunkt als die umkristallisierten Produkte.

3.2.1.2 Acylierungen mit Z-Val

Im Gegensatz zum problemlosen Kupplungsverhalten gegenüber Z-Gly zeigen Methylenpeptide bei Umsetzungen mit Z-Val im DC die Bildung zweier Produkte. Nach der Aufarbeitung der Reaktionslösung auf Neutralkörper erhält man ein Öl, das sich mit Hilfe der präparativen Dickschichtchromatographie oder der Säulenchromatographie in zwei Komponenten auf-trennen lässt. Die Identifizierung mittels Instrumental-analyse zeigt, dass neben dem erwarteten Tripeptid-Imidazo-lidinon (A) zusätzlich das Urethan (B) gebildet wurde. Die Bildung eines Urethans ergibt sich aus der grundsätz-lich zweiseitigen Reaktionsmöglichkeit der gemischten Anhydride:



Der Weg A beinhaltet einen nucleophilen Angriff des Peptidstickstoffes an der Carbonylgruppe der Aminosäure und eine gleichzeitige Spaltung des Anhydrids bei 'a'. Der Weg B, der zu einer Urethanbildung führt, ist gegeben durch einen Angriff der Aminokomponente auf das Kohlensäurecarbonyl.

Allgemein wird der Verlauf einer Acylierungsreaktion mit gemischten Anhydriden bestimmt durch sterische und elektronische Effekte der Substituenten sowohl im gemischten Anhydrid als auch in der Aminokomponente.

Dabei lassen sich die sterischen Effekte relativ leicht abschätzen. Der nucleophile Angriff des Amins ist sterisch an demjenigen Carbonyl-C begünstigt, das den weniger raumerfüllenden Substituenten trägt. Bei der Verwendung von Valin anstelle des Glycins ergeben sich somit in den beiden Uebergangszuständen beträchtliche Aenderungen der sterischen Situationen. Das Zusammenspiel der elektronischen Effekte ist komplexer. Was sterisch günstig ist, kann elektronisch ungünstig sein, sodass sich die beiden Reaktionsmöglichkeiten konkurrenzieren und die beiden möglichen Produkte nebeneinander entstehen. Trotzdem bei den gemischten Anhydriden die Elektrophilie des Kohlensäure-C durch den mesomeren Einfluss des zusätzlichen Sauerstoffes herabgesetzt wird, ist bei sperrigen Aninokomponenten die Bildung von Urethanen zu beobachten. Tarbell (32) macht hierfür ausschliesslich sterische Faktoren verantwortlich. So zeigen

Umsetzungen verschiedener Anhydride $R_1-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{O}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{OEt}$ mit N-Methyl-anilin den Einfluss von R_1 auf die Produktbildung. Während bei $R_1 = i\text{-Butyl}$ (Isovaleriansäure) 64 % Isovaleriansäuremethylanilid und nur Spuren von Phenylmethyleurethan entstehen, ergeben Versuche mit $R_1 = t\text{-Butyl}$ (Pivalinsäure) 32 % Urethan und nur Spuren von Amid. Diese gegenteilige Verhaltensweise lässt sich nur mit den Aenderungen im Bereich der α -Substitution der Carbonsäure erklären.

Dieser Einfluss der Carbonsäure zeigt sich nun auch bei den Kupplungen des Methylenderivats von $\text{Phe-}\overset{\text{CHH}}{\text{Ala}}\text{-OBut}$ mit Z-Val. Bedingt durch die sterische Hinderung der β -Verzweigung beim Valin erhält man das gewünschte Tripeptidimidazolidinon Z-Val- $\overset{\text{CHH}}{\text{Phe}}\text{-Ala-OBut}$ nur mit einer Ausbeute von ca. 50 % (DC-Auswertung). Zu rund 40 % bildet sich das Urethan (B), das sich trotz Anwendung verschiedener Trennverfahren nicht sauber vom Hauptprodukt abtrennen liess.

Bei gemischten Anhydriden zwischen zwei Carbonsäuren:

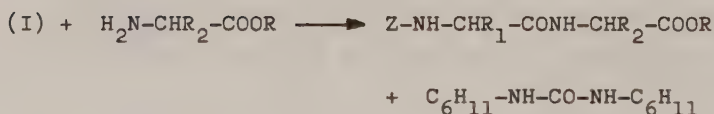
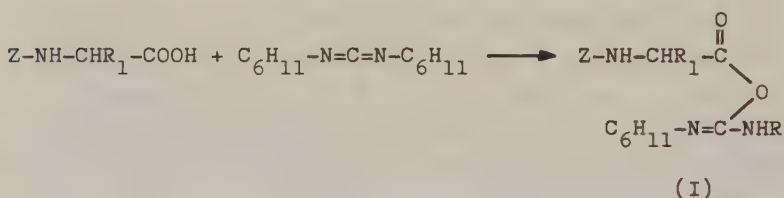
$\text{R}_1\text{-}\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}\text{-O-}\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}\text{-R}_2$ bestimmen die Reste R_1 und R_2 sowohl den relativen elektrophilen Charakter der beiden Carbonyl-Kohlenstoffatome als auch die relative Stabilität der Abgangsgruppen $\text{RCOO}^\ominus$. Die Situation ist also elektronisch weniger eindeutig als bei den Alkoxykohlenensäure-Carbonsäure-Anhydriden und dementsprechend fallen die sterischen Verhältnisse hier noch stärker ins Gewicht. Ist dagegen $\text{R}_1\text{CO-}$ ein N-acylierter α -Aminoacylrest, so erhöht sich die Nucleophilie soweit, dass bei genügender Sperrigkeit von R_2 ein einheitliches Produkt entstehen kann.

3.2.1.3 Acylierungen mit anderen N-Acyl- α -Aminosäuren

Nach den Kupplungen mit Glycin und Valin erschien es interessant, die Verwendbarkeit der gemischten Kohlenäureanhydride auch bei Acyl-Aminosäuren zu überprüfen, die zwar nicht so einfach gebaut sind wie Glycin, die aber auch keine ungünstige sterische β -Verzweigung aufweisen wie das Valin. Orientierende Versuche mit Z-Ala, Z-Leu und Pht-Leu zeigen, dass durchaus gute Ergebnisse zu erwarten sind. Die Ausbeuten lagen roh zwischen 80 und 90 %, nach dem Umkristallisieren durchschnittlich bei 70-75 %. Urethanbildung war nicht festzustellen (DC, MS).

3.2.2 Kupplungen unter Verwendung von Dicyclohexyl-carbodiimid (DCCI)

Obwohl seit langem bekannt, wurden Carbodiimide erst 1955 von Sheehan und Hess (25) zur Knüpfung von Peptidbindungen eingesetzt. Zu einer Methylenchlorid-Lösung bestehend aus je 1 Äquivalent einer N-acylierten Aminosäure und eines Aminosäureesters gibt man 1 Äquivalent DCCI. Die Reaktion verläuft unter Bildung einer Peptidbindung und eines Harnstoffderivats als unvermeidliches Nebenprodukt:



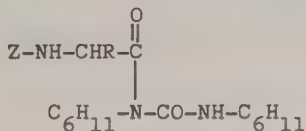
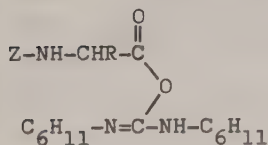
Wegen ihrer einfachen Handhabung, der hohen Reaktivität und der erzielten Ausbeuten gehört die Carbodiimi-Methode zu den populärsten Kupplungsmethoden in der Peptidchemie.

So lassen sich die verschiedenen N,N'-Methylenpeptidester mit Z-Gly und DCCI, dem am meisten verwendeten Carbodiimid, rasch und mit guten Ausbeuten acylieren. Die Rohprodukte zeichnen sich durch eine ausserordentliche Reinheit aus; einzig die Abtrennung des mitentstandenen Dicyclohexylharnstoffes bereitet einige Schwierigkeiten. Da in den

meisten organischen Lösungsmitteln unlöslich, lässt sich das Harnstoffderivat durch Filtration des wiederholt gelösten Rohproduktes ausreichend vom gewünschten Tripeptid abtrennen. Die Ausbeuten liegen bei durchschnittlich 70 % und sind damit deutlich niedriger als bei der gemischten Anhydrid-Methode. Wie sich an den folgenden beiden Beispielen zeigt stimmen die erhaltenen Produkte bezüglich Schmelzpunkt und optischem Drehwert mit den über gemischte Anhydride erhaltenen überein:

Peptid	DCCI		gem. Anhydride	
	mp.	$[\alpha]_D^{20}$	mp.	$[\alpha]_D^{20}$
Z-Gly- $\begin{array}{c} \text{CHH} \\ \text{Phe-Ala-OBut} \end{array}$	153-154°	+ 132°	153-154°	+ 134°
Z-Gly- $\begin{array}{c} \text{CHH} \\ \text{Phe-Val-OBut} \end{array}$	163-165°	+ 98°	165-166°	+ 97°

Wird unter gleichen Bedingungen anstelle von Z-Gly, Z-Val zur Kupplung eingesetzt, so zeigt das DC eine unvollständige Umsetzung. Bei Verlängerung der Reaktionszeit auf 48 h und Temperaturerhöhung auf 40°C (Werte für Z-Gly: 16 h, ZT) verbessert sich der Umsetzungsgrad, steigt aber nicht auf 100 %. Auch hier begünstigen längere Reaktionszeiten und höhere Temperaturen gewisse Nebenreaktionen. Dazu gehört vor allem die Umlagerung des ursprünglich gebildeten O-Acyl-iso-Harnstoffderivats zu einem N-Acyl-Harnstoffderivat, das keinerlei acylierende Wirkung besitzt:



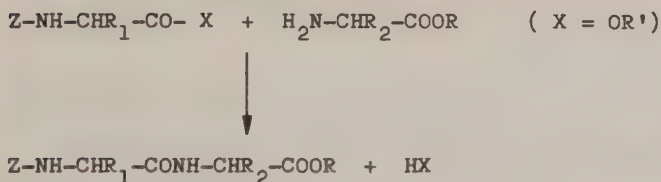
Da diese Umlagerung im Gegensatz zu der Kupplungsreaktion kinetisch erster Ordnung ist, wirkt sie sich im Laufe der Umsetzung, d.h. bei sinkenden Konzentrationen an O-Acyl-iso-Harnstoff und Methylenpeptidester, zunehmend stärker aus. Sie kann bei langsam reagierenden Komponenten Ursache für eine unvollständige Kupplung sein. So zeigen Chromatogramme der Reaktionslösungen bei Z-Val-Kupplungen das Auftreten eines Flecks, der möglicherweise einem N-Acyl-Harnstoffderivat zuzuschreiben ist. Diese Vermutung konnte zwar weder mittels MS noch mittels NMR bestätigt werden. Jedenfalls dürfte diese Verunreinigung dafür verantwortlich sein, dass es nicht gelang, Z-Val-Kupplungsprodukte zu kristallisieren. Trotzdem also zur ausreichenden Charakterisierung einige Daten fehlten (Analysenwerte, Schmelzpunkt, genauer optischer Drehwert), liess sich bei der Kupplung von Z-Val mit $\begin{array}{c} |CHH| \\ \text{Phe-Ala-OBut} \end{array}$ anhand der spektroskopischen Daten feststellen, dass das gewünschte nicht-terminal überbrückte Tripeptid vorlag; es wurde mit einer durchschnittlichen Ausbeute von 80 % erhalten.

Trotz den genannten Unzulänglichkeiten bringt das DCCI-Verfahren gegenüber den gemischten Anhydriden bei Kupplungen mit Z-Val spürbare Verbesserungen, indem sie, ungeachtet erheblicher Nebenproduktbildung die Synthese von $\begin{array}{c} |CHH| \\ \text{Z-Val-Phe-Ala-OBut} \end{array}$ in ausreichender Ausbeute und Reinheit ermöglicht.

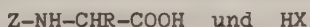
Eine Verbesserung vor allem der Reinheit der Rohprodukte wäre denkbar bei der Verwendung wasserlöslicher Carbo-diimide, wie sie von Sheehan (33) vorgeschlagen wurden.

3.2.3 Kupplungen unter Verwendung von 2-Pyridyl-thiolesteren

Eine weitere Möglichkeit zur Knüpfung von Peptidbindungen besteht in der Verwendung aktiver Ester. Die kinetisch notwendige Aktivierung des Esters geschieht durch Einbau stark elektronenziehender Substituenten in der Alkoholgruppe. Diese bewirken eine erhöhte Elektrophilie am Carboxyl-C und beschleunigen damit die Reaktion mit einem Nucleophil nach folgender Gleichung:



Formal könnte man einen solchen Ester als Anhydrid der beiden Säuren:



auffassen und damit die aktivierten Ester als gemischte Anhydride betrachten, dies umso mehr als alle brauchbaren HX relativ sauer sind. Auf Grund ihres unterschiedlichen chemischen Verhaltens erscheint eine Differenzierung jedoch richtig. So sind gemischte Anhydride wesentlich reaktiver. Selbst unter milden Bedingungen können sie nicht nur Amine oder Aminosäuren acylieren, sondern ebenso alkoholische, phenolische oder Mercaptogruppen. Analoge Reaktionen bei aktiven Estern könnten durch Umesterungen stattfinden. Diese treten aber normalerweise nicht unter milden Bedingungen und ohne Katalyse auf. So sind aktive Ester weitaus

hydrolysebeständiger als gemischte Anhydride. Oft werden sie sogar aus kochendem Alkohol umkristallisiert. Ein Hauptunterschied besteht aber darin, dass aktive Ester wegen ihrer Struktur nur ein einziges Acylierungsprodukt bilden können. Die so bedingte einheitliche Reaktionsweise macht sie für Kupplungen mit den relativ langsam reagierenden Imidazolidinonpeptiden besonders interessant, da hier, wie die Kupplungen mit gemischten Anhydriden und DCCI zeigen, die Hauptproblematik jeweils in der Abtrennung unerwünschter Acylierungsprodukte liegt. Der allgemein geringeren Reaktivität muss durch die Auswahl geeigneter aktiver Ester Rechnung getragen werden.

Die von Young (26) beschriebenen 2-Pyridyl-thiolester N-acylierter Aminosäuren gehören zu einer Gruppe neuentwickelter aktiver Ester, die weit reaktiver als konventionelle aktive Ester - p-Nitrophenylester, Cyanomethylester - sind. Diese erhöhte Reaktivität wird einer intramolekularen Basenkatalyse durch den Ring-Stickstoff zugeschrieben. Bei Kupplungsreaktionen äussert sich diese Katalyse in kurzen Kupplungszeiten und hohen Ausbeuten selbst bei sterisch gehinderten Aminosäuren.

Die bevorzugte Methode zur Darstellung von 2-Pyridyl-thioleestern besteht in der Umsetzung einer N-acylierten Aminosäure mit 2-Mercaptopyridin unter Zusatz von DCCI. Die aus Essigester-Petroläther kristallisierenden Ester sind bei ZT stabil. Durch Feuchtigkeit oder in wässriger Lösung zersetzen sie sich nur langsam. Young setzt die 2-Pyridyl-thiolester meist im Unterschuss ein, um ihre möglichst quantitative Umsetzung zu bewirken. Diese Methode scheint jedoch für den schrittweisen Aufbau von Peptiden von der Aminosäureseite her zu aufwendig, weshalb wir bei den Kupplungen

mit N,N'-Methylenpeptiden die Darstellungsmethode modifizierten. Ähnlich den Reaktionen mit gemischten Anhydriden zeigt sich auch bei den 2-Pyridyl-thioestern ein beträchtlicher Reaktivitätsunterschied zwischen Z-Gly- und Z-Val-Derivaten, die nach Young abgekürzt wie folgt geschrieben werden: Z-Gly-SPy und Z-Val-SPy.

3.2.3.1 Acylierungen mit Z-Gly-SPy

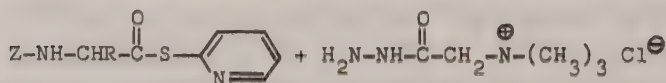
Der N,N'-Methylenpeptidester $\begin{array}{c} | \text{CHH} | \\ \text{Phe-Ala-OBut} \end{array}$ wurde mit Z-Gly-SPy nach der Vorschrift von Young (26) acyliert, wobei aber zwecks Erzielung einer möglichst vollständigen Umsetzung eine äquimolare Menge des Mercaptopyridylesters (bezogen auf die Aminokomponente) zum Einsatz gelangte. Nach einer Reaktionszeit von 16 h bei Z T zeigt das DC vollständige Umsetzung an. Nach der Aufarbeitung erhielt man wiederholt Rohausbeuten von über 90 %, und nach zweimaligem Umkristallisieren aus Essigester-Petroläther Reinausbeuten von 75-80 %. Die so erhaltenen nichtterminalen N,N'-Methylenpeptide zeigen die gleichen Schmelzpunkte, optischen Drehwerte und Spektren wie diejenigen, die über gemischte Anhydride erhalten wurden. Die Aufarbeitung durch Ausschütteln mit verdünnter Säure und Base zeigt, dass sich das 2-Mercaptopyridin wesentlich schlechter vom Produkt abtrennen lässt als etwa das bei Kupplungen mit p-Nitrophenylestern erhaltene p-Nitrophenol. Die geringe Löslichkeit des 2-Mercaptopyridins in Säuren und Basen erfordert mehrmaliges Ausschütteln, da sonst schlecht kristallisierende Rohprodukte entstehen.

3.2.3.2 Acylierungen mit Z-Val-SPy

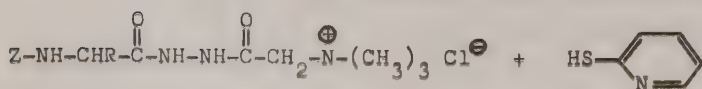
Der Methylenpeptidester $\begin{array}{c} | \text{CHH} | \\ \text{Phe-Ala-OBut} \end{array}$ lässt sich auch mit Z-Val-SPy zum gewünschten Tripeptidimidazolidinon umsetzen. Erwartungsgemäss sind die erforderlichen Reaktionsbedingungen energischer als bei Kupplungen mit dem Glycinderivat. Um quantitativen Umsatz zu erzielen, muss man den Valinester im Ueberschuss einsetzen. Ein 100-proz. Ueberschuss an aktivem Ester, bezogen auf die Aminokomponente, und Essigester als Lösungsmittel bewirkte nach 40 h bei 40°C einen praktisch quantitativen Umsatz ohne Nebenproduktbildung (DC).

Problematisch zeigt sich allein die Aufarbeitung des Reaktionsgemisches, da der überschüssige Mercaptopyridylester relativ schwierig zu entfernen ist. Young (26) schlägt Zerstörung des Esters durch Hydrolyse vor. Z-Val-SPy zersetzt sich selbst nach 2 Tagen bei 50°C nur unvollständig.

Dagegen lässt sich überschüssiger 2-Pyridyl-thiolester quantitativ und in kurzer Zeit mit Girard -T-Reagens zu einem Amid umsetzen, das auf Grund seiner wasserlöslichmachender Ammoniumgruppe durch Extraktion mit Wasser abgetrennt werden kann:



' Girard T '



Der aktive Ester zeigt sich also gegenüber Girard T wesentlich reaktiver als gegen Wasser (Hydrolyse). Dies war im Hinblick auf die Nucleophilie der Hydrazin-Derivate nicht unerwartet.

Nach der Abtrennung des gebildeten wasserlöslichen Amids und des freigewordenen Thiols erhält man das erwartete Produkt $\text{Z-Val-}\overset{\text{CHH}}{\text{Phe}}\text{-Ala-OBut}$ in einer Rohausbeute von 85 %. Trotz sorgfältiger Abtrennung der Nebenprodukte - 2-Mercaptopyridin und Z-Val - lässt sich diese Tripeptidimidazolidinon äusserst schlecht kristallisieren. Die Hauptmenge wurde nach intensiver Trocknung am Hochvakuum als Schaum erhalten, der sich sowohl im DC als auch nach Massgabe der MS und NMR Spektren als einheitlich erwies.

Die hohe Ausbeute und Reinheit des erhaltenen Produktes zeigt, dass sich 2-Pyridyl-thiolester zur Kupplung von Imidazolidinonpeptiden eignen. In Verbindung mit dem sterisch stark gehinderten Valin scheint diese Methode sogar die einzig brauchbare zu sein.

3.2.4 Diskussion

Die in diesem Abschnitt geschilderten Kupplungen zeigen, dass sich terminale N,N'-Methylenpeptidester mit drei verschiedenen Kupplungsmethoden und unter verschiedenen Bedingungen erfolgreich acylieren lassen. Der erfolg hängt weitgehend von der Wahl der Kupplungsmethode und der Art der acylierenden Aminosäure ab. Glycin lässt sich nach allen gewählten Methode umsetzen, während für Umsetzungen mit Z-Val einzig die DCCI und die Mercaptopyridylestermethode erfolgreiche Kupplungen versprechen.

Auf Grund ihrer Reaktivität und ihrer leichten Handhabung scheinen die gemischten Anhydride besonders gut zu Kupplungen mit einfachen Aminosäuren geeignet. Aminosäuren mit sterischer Hinderung, bedingt durch eine Verzweigung in β -Stellung zur Carboxylgruppe, lassen sich allerdings nur zu untrennbaren Reaktionsgemischen umsetzen. Diese sterisch gehinderten Aminosäuren erfordern drastischere Reaktionsbedingungen, d.h. höhere Temperaturen und/oder längere Reaktionszeiten. Somit ist man hier auf Kupplungsmethoden angewiesen, die einen möglichst einheitlichen Reaktionsverlauf gewährleisten. Die 2-Pyridyl-thiolester-Methode erscheint vorläufig am besten zur Kupplung sterisch gehinderter Aminosäuren mit N,N'-Methylenpeptidestern geeignet. Sie lieferte bei der Synthese von Z-Val^{|CHH|}-Phe-Ala-OBut die besten Resultate.

3.3 Acylierungen der Aethylidenimidazolidinone

Die Umsetzungen der N,N'-Aethylidenpeptidester mit Acylierungsmitteln unterscheiden sich von denjenigen der Methylen-derivate nachhaltig. Dieser Unterschied lässt sich im wesentlichen zwei Faktoren zuschreiben:

- Aethylidenpeptide sind gegen acylierende Reagenzien weit-
aus weniger reaktiv als die entsprechenden Methylen-
derivate, da die Methylgruppe am C-2 des Imidazolidinon-
rings eine zusätzliche sterische Hinderung bedingt.
- Aethylidenpeptide liegen auf Grund des neugebildeten
Asymmetrie-Zentrums am C-2 des Imidazolidinonrings

gewöhnlich als Isomerengemische vor.¹⁾ Ihre Acylierung ergibt demzufolge ebenfalls zwei Isomere und erschwert dadurch wesentlich die Reindarstellung.

Prinzipiell lassen sich Aethylidenpeptide mit den gleichen Kupplungsmethoden acylieren wie Methylenpeptide. Die geringere Reaktivität begünstigt aber zwangsläufig die Bildung von Nebenprodukten. Dies kommt im folgenden deutlich zum Ausdruck.

3.3.1 Acylierung von $\begin{array}{c} | \text{CHR} | \\ \text{Phe-Ala-OBut} \end{array} \text{ (R=CH}_3\text{)} \text{ mit Z-Gly und Chlorameisensäure-i-butylester}$

Unter den gleichen Bedingungen wie das Methylen-derivat reagiert das Aethyliden-derivat weitaus träger. Dieses Verhalten war im Hinblick auf die Vorversuche zur Acetylierung, Benzoylierung und Carbobenzoxylung (vgl. Abschnitt 2.3.4) nicht unerwartet.

Das Aethyliden-derivat setzt sich unter den für die Methylenverbindungen günstigen Bedingungen nur unvollständig um. Längere Reaktionszeiten und höhere Temperaturen bewirken zwar einen besseren aber keinen quantitativen Umsatz. Aus den folgenden Daten lassen sich die bisher optimalen Reaktionsbedingungen erkennen: Temperatur ungefähr 10°C, Reaktionszeit 24 h.

1) Eine Ausnahme bildet das Aethyliden-derivat

$\begin{array}{c} | \text{CHR} | \\ \text{Pro-Leu-Glu(OBut)-Phe-OBut} \end{array} \text{ (R=CH}_3\text{)} \text{ von Cardinaux (8), das eine einheitliche Konfiguration am C-2 besitzt.}$

Peptid	Temp.	Reakt. zeit	Umsatz nach DC	Ausbeute	
				roh	nach Umkrist.
$\begin{array}{c} \text{Z-Gly} \begin{array}{ c} \text{CHR} \\ \hline \text{Phe-Ala-OBut} \end{array} \\ (R=\text{CH}_3) \end{array}$	- 15°	4 h	20 %	25 %	17 %
		24	40	46	28
		48	40	58	-
	0	24	50	60	-
	+ 10	4	30	32	13
		24	80	85	47
		48	80	92	-
	+ 25	24	85	91	-
	+ 40	4	40	62	-
		24	90	105	-

Der Reaktionsverlauf kann mittels DC anhand der Abnahme der Aminokomponente verfolgt werden. Durch Vergleich mit Standardlösungen an Dipeptid-Imidazolidinon erhält man so eine halbquantitative Aussage über den Umsetzungsgrad. Die Differenz zwischen der auf diese Weise geschätzten und der tatsächlich erhaltenen Rohausbeute kann somit als Indiz für das Ausmass der Bildung von Nebenprodukten betrachtet werden. Tatsächlich lassen sich letztere dann auch sowohl im DC als auch in den MS-Spektren nachweisen. Dabei ist neben Urethanbildung (vgl. Abschnitt 3.2.1.2) das Auftreten von Z-Gly-i-Butylester zu vermerken, der offenbar durch Zerfall des gemischten Anhydrids entsteht.

Die Bildung eines Urethans bei der Z-Gly-Kupplung demonstriert einmal mehr, dass diese sowohl von der Art des gemischten Anhydrids wie auch von der Aminokomponente abhängt. So genügt bei der Kupplung von Z-Gly mit $\begin{array}{|c} \text{CHR} \\ \hline \text{Phe-Ala-OBut} \end{array}$ ($R=\text{CH}_3$) offenbar die zusätzliche Methylgruppe am C-2 des Imidazolinonrings zur vermehrten Urethanbildung.

Einen ähnlich ungünstigen Einfluss einer β -ständigen Methylgruppe beobachtete auch Tarbell (32) bei der Reaktion sekundärer Amine mit gemischten Benzoessäure-Kohlensäure-Anhydriden. Während die Umsetzung von Piperidin mit dem Anhydrid aus Benzoessäure und Chlorameisensäureäthylester zu 50 % das Amid und zu 34 % das Urethan ergibt, verschlechtert sich dieses Verhältnis bei der Verwendung von 2-Methyl-piperidin auf 0,22. Ein ähnliches Verhalten zeigen auch andere sekundäre Amine und ihre 2-Methyl-derivate.

Das Vorliegen der Aethylidenpeptide als Isomerengemische erschwert ihre Reindarstellung zusätzlich. Dabei ist festzuhalten, dass das eine Isomere der terminalen Aethylidenpeptide bevorzugt acyliert wird. Trotz dieser Anreicherung des einen Tripeptidisomeren gelingt selbst mit Hilfe der Säulenchromatographie keine saubere Abtrennung. Da auch die Abtrennung der Nebenprodukte nur unvollständig gelingt, ergeben sich vielfach so unreine Produkte, dass sich ihre Isolierung nicht lohnt.

3.3.2 Acylierung von $\begin{array}{|c|} \text{CHR} \\ \text{Phe-Ala-OBut (R=CH}_3\text{)} \end{array}$ mit Z-Val und Chlorameisensäure-i-butylester

Ein noch weit ungünstigeres Verhältnis von Amid- zu Urethanbildung ergab sich bei den Kupplungen des Aethylidenderivats mit Z-Val. Beobachtete man Urethanbildung schon bei der Umsetzung von Z-Val mit den verschiedenen Methylenpeptidestern (vgl. Abschnitt 3.2.1.2), so erhielt man bei den Umsetzungen des Aethylidenderivats das Urethan als Hauptprodukt in einer Ausbeute von ca. 30-40 %, das erwartete N,N'-Aethylidentripeptid dagegen nur in Spuren.

Diese Ergebnisse zeigen, dass bei Kupplungen von Aethyliden-

peptiden gemischte Anhydride zwar bedingt brauchbar sind (vgl. Abschnitt 3.3.1), dass sie aber im allgemeinen den Anforderungen nicht zu genügen vermögen.

3.3.3 Acylierungen mit Z-Val-SPy

Die Kupplungen verschiedener Methylenpeptidester mit Z-Val-SPy haben gezeigt, dass 2-Pyridyl-thiolester gute Ergebnisse selbst mit sterisch gehinderten Peptiden liefern.

Setzt man das Aethylidenderivat $\begin{array}{c} | \text{CHR} | \\ \text{Phe-Ala-OBut} \end{array}$ ($\text{R}=\text{CH}_3$) mit Z-Val-SPy um, so lässt sich aus der Verfolgung des Reaktionsverlaufes mittels DC folgendes schliessen:

- Die beiden Edukte reagieren miteinander unter Ausbildung des gewünschten Produktes. Eine vernünftige Reaktionsgeschwindigkeit wird nur erreicht, wenn der aktive Ester im Ueberschuss eingesetzt wird.
- Da eine bimolekulare Reaktion vorliegt, nimmt die Reaktionsgeschwindigkeit mit der Fortdauer der Reaktion ab.
- Auch bei längeren Reaktionszeiten ist keine vollständige Umsetzung zu erreichen. Da die beiden Isomeren des Aethylidenpeptidesters unterschiedliche R_f -Werte besitzen, lässt sich feststellen, dass das eine Isomere bevorzugt reagiert:

Nach einer Reaktionszeit von 16 h lässt das DC noch beide Isomeren erkennen; die Grösse und Intensität der Flecken deutet aber darauf hin, dass das eine Isomere bereits zu einem grossen Teil mit Z-Val-SPy in Reaktion getreten, das andere aber unverändert geblieben ist. Nach 48 h kann nur noch ein Isomeres festgestellt werden.

Nach der Aufarbeitung des Reaktionsgemisches (vgl. Abschnitt 3.2.3.2) erhält man eine Rohausbeute von ca. 40 %. Trotz sorgfältigster Aufarbeitung ist das Rohprodukt nicht frei von Nebenprodukten (2-Mercaptopyridin, Z-Val-SPy). Es gelang nicht, das mittels MS und IR als solches identifizierte Z-Val-^{|CHR|}Phe-Ala-OBut ($R=CH_3$) zu kristallisieren.

3.3.4 Diskussion

Die Kupplungsversuche des Aethylidenpeptidesters

^{|CHR|}Phe-Ala-OBut ($R=CH_3$) mit Z-Gly bzw. Z-Val unter Verwendung gemischter Anhydride und 2-Pyridylthiolester zeigen, dass N,N'-Aethylidenderivate zur präparativen Darstellung reiner Tripeptidimidazolidinone nur bedingt geeignet sind. Auf Grund des Auftretens zweier isomerer Formen und einer geringen Reaktivität lassen sich terminale Aethylidenpeptide nur mit äusserst geringen Ausbeuten umsetzen, wobei nur unreine, nicht kristallisierende Produkte entstehen. Dabei erweist sich die Existenz eines Isomerengemisches als weitaus problematischer als die geringe Reaktivität, die vielleicht mit geeigneteren Kupplungsmethoden kompensiert werden könnte.

3.4 Acylierung eines Cyclohexylidenimidazolidinons

Cyclohexylidenpeptidester lassen sich selbst mit reaktiven Acylierungsmitteln unter drastischen Bedingungen nicht acylieren (vgl. Abschnitt 2.3.4). Dieselbe Reaktionsträgheit zeigt sich erwartungsgemäss bei den Acylierungsversuchen mit Aminosäurederivaten. Mit Z-Gly bzw. Z-Val und i-Butylchloroformat lässt sich weder eine Amid- noch eine Urethanbildung feststellen.

Selbst mit den entsprechenden 2-Pyridyl-thioleestern zeigt sich keinerlei Umsetzung. Dabei weist das Cyclohexyliden-derivat unter allen Reaktionsbedingungen eine aussergewöhnliche Stabilität auf, so dass es unverändert aus diesen Umsetzungen zurückgewonnen werden kann.

Eine Bestätigung für diese Verhaltensweise findet sich in den Arbeiten von du Vigneaud (5). Dieser Autor hat nicht versucht, Peptidkupplungen an 4-Imidazolidinonen durchzuführen. Im Gegenteil: Er benützt die N,N'-Isopropylidengruppe als Aminoschutzgruppe bei der Kupplung von

$\begin{array}{c} \text{CRR} \\ | \\ \text{Cys(Bzl)} \end{array} \text{--- Tyr-OH (R=CH}_3\text{)} \text{ und Ile-Glu-Asn-Cys(Bzl)-Pro-Leu-} \\ \text{---Gly-NH}_2 \text{ mit gemischten Anhydriden.}$

Aus unseren Versuchen lassen sich folgende Feststellungen treffen:

- Die Cyclohexylidengruppe erweist sich sowohl bei Acylierungs- als auch bei Kupplungsreaktionen de facto als Aminoschutzgruppe, indem sie eine Acylierung unter den verschiedensten Bedingungen und mit ausgewählten Methoden verhindert.
- Als Ursache für diesen Schutzgruppeneffekt dürfte vor allem die sterische Hinderung zu betrachten sein.
- Da die Cyclohexylidengruppe durch Hydrolyse wieder abgespalten werden kann (vgl. Abschnitt 2.3.2), erfüllt sie weitgehend die Forderung, die an eine Schutzgruppe gestellt wird. Eine beschränkte Anwendung der Cyclohexylidengruppe als Aminoschutzgruppe bei speziellen präparativen Problemen ist damit denkbar.

4. VERGLEICHSSUBSTANZEN

Eine hinreichende Charakterisierung der chemischen und spektroskopischen Eigenschaften nichtterminaler N,N'-Alkylidenpeptide erfordert einen Vergleich mit den jeweils analogen unverbrückten Tripeptiden. Im folgenden wird deshalb die Synthese dieser Vergleichspeptide kurz beschrieben. Da sich eine vergleichende Darstellung auch auf die deblockierten Tripeptide erstrecken muss, wird auch die Abspaltung der verwendeten Schutzgruppen behandelt.

4.1 Synthese der unverbrückten Vergleichstripeptide

Die im folgenden aufgeführten Vergleichstripeptide

Peptid	mp.	$[\alpha]_D^{20} *$
Z-Gly-Phe-Ala-OBu ^t	106-107°	- 22°
Z-Gly-Phe-Val-OBu ^t	107-108	- 16
Z-Gly-Phe-Leu-OBu ^t	130-131	- 20
Z-Gly-Phe-Phe-OBu ^t	72- 73	- 6
Z-Val-Phe-Ala-OBu ^t	145-147	- 55

*) Alle Drehwerte sind in Methanol gemessen; c = 0,3

wurden von der C-terminalen Seite schrittweise aufgebaut unter Verwendung der bereits diskutierten Anhydrid-Methode in der Ausführungsform von Tilak (24). Die dabei verwendeten t-Butylester wurden nach Roeske (34) in Form ihrer

Hydrochloride dargestellt und unter Verwendung von i-Butylchloroformiat mit Z-Phe gekuppelt. Nach der Hydrogenolyse der Z-Gruppe wurde das freie Dipeptid mit der folgenden Z-geschützten Aminosäure zum Tripeptid gekuppelt.

4.2 Abspaltung der Schutzgruppen

Sowohl die nichtterminalen N,N'-Alkylidenpeptidester wie die unverbrückten Vergleichsubstanzen weisen dieselben Schutzgruppen auf. N-terminal sind diese Peptide durch die Carbobenzoxy- oder Z-Gruppe, C-terminal durch den t-Butylester geschützt. Bei der Abspaltung der Schutzgruppen zeigen sich zwischen den verbrückten und unverbrückten Peptiden nur unmerkliche Unterschiede; das Abspaltungsverfahren ist bei beiden gleich.

Zur Durchführung der Abspaltung der Z-Gruppe und der t-Butylestergruppe sind folgende Bemerkungen zu machen:

- Es ist vorteilhaft zuerst die t-Butylgruppe abzuspalten, die erhaltene Säure durch Umkristallisieren zu reinigen und sodann die Z-Gruppe hydrogenolytisch abzuspalten. Die auf diesem Wege erhaltenen Produkte sind schon ohne Umkristallisieren äusserst rein und enthalten vor allem keine schwer abtrennbaren anorganischen Salze, wie dies bei umgekehrter Abspaltungsreihenfolge unvermeidlich wäre.
- Die Abspaltung des t-Butylesters erfolgt mit Trifluoressigsäure (TFA). Dabei lässt man das Peptid in möglichst wenig TFA während 30 Min. bei ZT stehen. Nach dieser Zeit ist die Abspaltung bei allen Peptiden vollständig. Die TFA-Lösung wird am Rotationsverdampfer eingeeengt, und die so erhaltene sirupöse Lösung in eisgekühlten, wasserfreien Aether eingetropft. Dabei erfolgt meist eine Aus-

fällung der Säure, die abfiltriert und aus Methanol-Aether umkristallisiert wird. Unterbleibt eine Ausfällung, so wird die TFA durch Zusatz von Methanol am Vakuum abgedampft. Die TFA reagiert dabei mit dem zugesetzten Methanol zum flüchtigen Methylester. Durch mehrmaliges Eindampfen unter wiederholter Aetherzugabe erhält man schliesslich die Säure TFA-frei zum Umkristallisieren.

- Die Abspaltung der Z-Gruppe erfolgt hydrogenolytisch in Methanol, mittels Pd/C als Katalysator. Dabei zeigt sich, dass die deblockierten unverbrückten Peptide eine geringere Löslichkeit aufweisen als ihre verbrückten Analoga. Sie kristallisieren deshalb oft während der Reaktion aus. Nach Lösen in heissem Wasser gelingt es jedoch, sie durch Filtration vom Katalysator abzutrennen.

5. PHYSIKALISCHER UND CHEMISCHER VERGLEICH ZWISCHEN VERBRUECKTEN UND UNVERBRUECKTEN PEPTIDEN

Die Einführung einer N,N'-Alkylidengruppe an einer bestimmten Stelle innerhalb eines Peptids bewirkt zwangsläufig eine strukturelle Veränderung der Peptidkette, die sich im physikalischen, chemischen und biochemischen Verhalten äussern muss. Der durch die zusätzliche Alkylidengruppe gebildete Imidazolidinonring verhindert die freie Drehbarkeit um die Bindung zwischen dem α -C und dem Carboxyl-C sowie zwischen dem α -C und der α -Aminogruppe und stellt somit eine gezielte Einflussnahme auf die Konformation des Peptids dar. Der Wegfall von zwei Amid-NH-Bindungen verhindert eine wirksame Wasserstoffbrückenbildung im Bereich des Imidazolidinonrings und dürfte dadurch das Assoziationsverhalten vor allem kleinerer Peptide nachhaltig beeinflussen. Durch den Wegfall der freien Drehbarkeit werden in nichtterminalen Alkylidenpeptiden zwei benachbarte Peptidbindungen in derselben Ebene fixiert, was bei längeren Peptidketten eine mögliche Ausbildung gewisser geordneter Strukturen(Helix) verhindern kann. Die N,N'-Alkylidengruppe ermöglicht aber auch eine Beeinflussung der enzymatischen Spaltbarkeit von Peptiden, da sie die Peptidbindung vor einem proteolytischen Angriff von Enzymen schützen könnte.

Mit den im folgenden aufgeführten Methoden möchten wir terminale und nichtterminale Alkylidenpeptide charakterisieren und ihr unterschiedliches Verhalten gegenüber den entsprechenden Vergleichspeptiden festhalten. Dabei ergibt sich aus Einzelbeobachtungen ein Gesamtbild, das wiederum zu gültigen Aussagen in Teilbereichen (Abspaltbarkeit nichtterminaler Alkylidengruppen, enzymatischer Abbau von N,N'-Alkylidenpeptiden) führt.

Eine umfassende Untersuchung vor allem des Einflusses des Imidazolidinonrings auf die Ausbildung höherer Strukturordnungen (Sekundär-, Tertiärstruktur) ist auf der Tripeptidstufe nicht möglich. Sie liesse sich jedoch an grösseren Peptiden oder bereits genau untersuchten Peptidhormonen (Bradikynin) mit Hilfe weiterer physikalischer Methoden (Röntgenstrukturanalyse, Dipolmessungen) verwirklichen.

Bei unserer Vergleichsanalyse beschränken wir uns im wesentlichen auf die N,N'-Methylenpeptide. N,N'-Aethylidenpeptide zeigen grundsätzlich das gleiche Verhalten wie ihre Methylenhomologen. Partielle Unterschiede sollen an den Beispielen von $\text{Z-Gly-Phe-}\overset{\text{CHR}}{\underset{|}{\text{Ala}}} \text{ (R=CH}_3\text{)-OBut}$ und $\text{Gly-Phe-}\overset{\text{CHR}}{\underset{|}{\text{Ala}}} \text{ (R=CH}_3\text{)}$ aufgezeigt werden.

5.1 Physikalisches Verhalten - Instrumentalanalyse

5.1.1 UV - Spektren

Der Vergleich der UV-Spektren der verschiedenen N,N'-Methylenpeptide mit ihren Vergleichspeptiden zeigt keine auffälligen Unterschiede. Beide Gruppen zeigen Absorptionen im Bereich von 250-260 nm entsprechend einer Aromatenabsorption und bei 200-230 nm bedingt durch die Absorption der Amidgruppen.

Im Aromatenbereich zeigen verbrückte wie unverbrückte Peptide ein identisches Verhalten. Sie stimmen sowohl in der Wellenlänge des Absorptionsmaximums als auch in der Intensität der Absorption (ϵ -Werte) überein. Die in der Tabelle angegebenen,

unterschiedlichen ϵ -Werte sind ausschliesslich durch die Anzahl der vorhandenen Aromatenchromophore (Z-Gruppe, zusätzliches Phe) bedingt.

UV - Daten	Aromatenbereich		Amidbereich	
	λ (nm)	ϵ	λ (nm)	ϵ
Z-Gly-Phe-Ala-OBut	254	390	208	10660
Z-Gly-Phe-Phe-OBut	255	560	209	13240
Z-Val-Phe-Ala-OBut	254	370	208	10440
Z-Gly-Phe-Ala-OBut	255	380	207	9640
Z-Gly-Phe-Phe-OBut	255	565	208	11860
Z-Val-Phe-Ala-OBut	255	360	207	9100
Gly-Phe-Ala	254	200	208	8460
Gly-Phe-Phe	255	505	209	11240
Val-Phe-Ala	254	265	208	9440
Gly-Phe-Ala	254	230	207	7300
Gly-Phe-Phe	254	510	208	10680
Val-Phe-Ala	254	260	206	7960

Alle Messungen wurden bei $c = 5 \cdot 10^{-4}$ Mol/l durchgeführt. Geschützte Peptide wurden in Methanol, deblockierte in Wasser als Lösungsmittel gemessen.

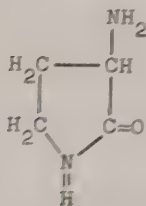
Im Amidbereich jedoch zeigen verbrückte Peptide signifikant höhere ϵ -Werte gegenüber ihren unverbrückten Homologen. Zudem ist bei ihnen der Beginn der Endabsorption nach höheren Wellenlängen verschoben.

Dieses Verhalten ist auch bei den terminalen Alkyliden-dipeptidestern festzustellen und steht im Einklang mit den Befunden von Edward (22) für einfache 4-Imidazolidinone und Cardinaux (2) für terminale N,N'-Alkylidenpeptide.

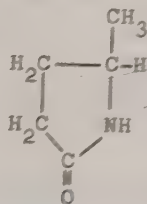
Diese erhöhte Amidabsorption der Imidazolidinonpeptide lässt sich durch Differenz-UV-Messungen besonders verdeutlichen: Werden in einem 2-Strahl-Spektrophotometer verbrückte und unverbrückte homologe Peptide mit jeweils gleicher Konzentration direkt gegeneinander gemessen, so zeigen verbrückte N,N'-Methylentripeptide eine stärkere Absorption im Bereich von 220 nm. Das dabei ermittelte $\Delta\epsilon$ von 2000-3000 lässt auf eine verstärkte $n \rightarrow \pi^*$ Absorption der verbrückten Peptide schließen, die nur mit elektronischen Veränderungen beim Ringschluss erklärt werden kann.

5.1.2 CD - Spektren

In der Literatur fehlen CD-Spektren optisch aktiver, monomerer Amide nahezu vollständig. Dies ist umso erstaunlicher als die CD-Spektroskopie häufig zum Studium von Polypeptiden (Assoziaten von Peptidketten, Helixbildung) verwendet wird. Erste Untersuchungen eines monomeren Amids verdanken wir Litman und Schnellman (35), die im ORD-Spektrum eines optisch aktiven Lactams (a) einen Cotton-Effekt bei 232 nm beobachteten.



(a)



(b)

Dieser bei einfachen Amiden erstmals festgestellte Cotton-Effekt bei einer $n \rightarrow \pi^*$ Bande ist bei Polypeptiden schon lange bekannt. Er wird bei kleinen Peptiden jedoch meist durch die NH_2 -Bande überdeckt, die ebenfalls im Bereich von 230 nm liegt.

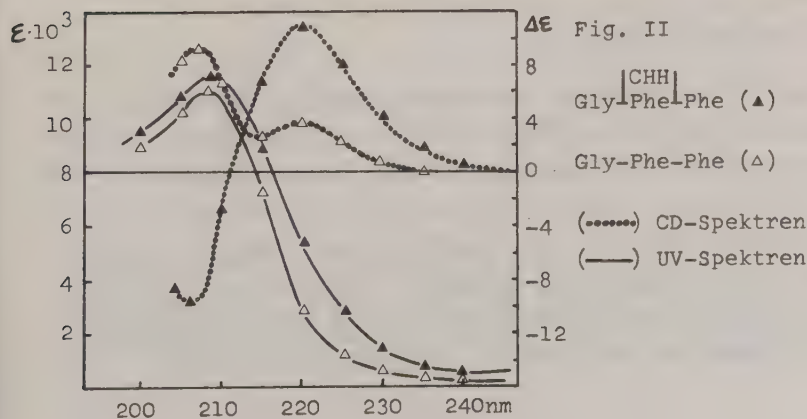
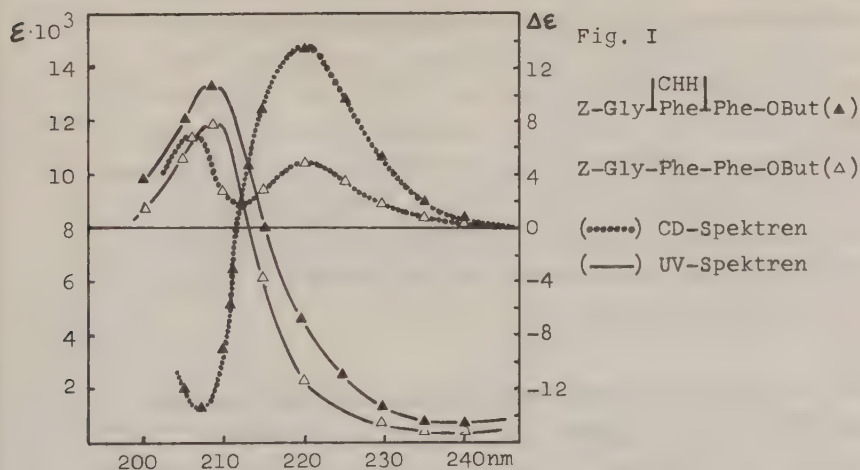
Ein ausführlicheres CD-Spektrum eines ähnlichen Amids (b) finden wir bei Urry (36). Das Lactam (b) zeigt in Wasser eine negative $n \rightarrow \pi^*$ -Bande bei 209 nm und eine positive $\pi \rightarrow \pi^*$ -Bande bei 190 nm. Im CD-Spektrum lassen sich diese beiden Bande deutlich feststellen, wohingegen im UV-Spektrum die $n \rightarrow \pi^*$ Bande weitgehend von der $\pi \rightarrow \pi^*$ -Bande überdeckt wird.

Ein ähnliches Verhalten können wir aus den UV- und CD-Spektren für unsere Methylenpeptide wie auch für die entsprechenden Vergleichspeptide feststellen. Die folgenden Spektren (s.u.) zeigen für das Methylenpeptid $\text{Z-Gly} \begin{array}{c} | \text{CHH} | \\ \text{---} \end{array} \text{Phe-Phe-OBut}$ wie auch für das deblockierte $\text{Gly} \begin{array}{c} | \text{CHH} | \\ \text{---} \end{array} \text{Phe-Phe}$ eine positive Absorptionsbande im CD-Spektrum bei $\lambda = 220 \text{ nm}$ entsprechend einem $n \rightarrow \pi^*$ Uebergang, welcher in den UV-Spektren nicht feststellbar ist. Die Methylenpeptide zeigen eine negative Absorptionsbande bei 208 nm entsprechend dem $\pi \rightarrow \pi^*$ Uebergang, während die Vergleichspeptide bei dieser Wellenlänge eine positive CD-Absorptionsbande aufweisen. Während bei den unverbrückten Vergleichspeptiden die $\pi \rightarrow \pi^*$ Bande weitaus intensiver ist, als die $n \rightarrow \pi^*$ Bande, sind bei den Imidazolidinonpeptiden beide Banden von vergleichbarer Intensität. Somit bestätigen die CD-Spektren die verstärkte $n \rightarrow \pi^*$ Absorption der Imidazolidinonpeptide, die wir bereits bei den Differenz-UV-Spektren festgestellt haben.

Da in der Literatur nur äusserst wenige CD-Spektren zu finden sind und bis heute nicht einmal feststeht, ob die

$n \rightarrow \pi^*$ Absorption von Amiden der Quadranten- oder Octantenregel folgt, lassen sich aus den CD-Spektren keine grundlegenden Informationen gewinnen. Sie erlauben aber immerhin das Feststellen der $n \rightarrow \pi^*$ Bande auf Grund der durch circularpolarisiertes Licht gegebenen Extinktionsdifferenz $\Delta\epsilon$.

UV und CD - Spektren



5.1.3 IR - Spektren

Ein komplexes Molekül besitzt eine grosse Zahl von Schwingungsmöglichkeit, an denen das gesamte Molekül teilnimmt. Jedoch sind einige dieser Schwingungen in erster Näherung auf Einzelbindungen oder funktionelle Gruppen (lokalisierte Schwingungen) beschränkt, während andere als Schwingungen des ganzen Moleküls aufgefasst werden müssen. In der Peptidchemie sind IR-Spektren deshalb ein wertvolles Hilfsmittel zum Nachweis von funktionellen Gruppen sowie zur Verfolgung von deren Umwandlungen. Sie erlauben insbesondere die Ueberwachung des Reaktionsverlaufes bei der Einführung und Abspaltung von Schutzgruppen. Darüber hinaus dienen IR-Spektren aber auch dazu, Struktur- und Konformationsänderungen festzustellen, die sich bei der Vergrösserung der Peptidkette ergeben können.

Der Einbau einer Alkylidengruppe in ein Peptidgerüst und der damit verbundene Wegfall von Amidprotonen beeinflusst nachhaltig die IR-Spektren der N,N'-Methylenpeptide. Ein Vergleich mit den entsprechenden unverbrückten Vergleichspeptiden zeigt die folgenden auffälligen Unterschiede:

Die Amid I und II Banden der Methylenpeptide (vgl. Tabelle) zeigen eine weitaus geringere Intensität als die der unverbrückten Vergleichspeptide. Es ist bekannt, dass die Amid II-Absorption bei substituierten Lactamen und Amiden fehlt und somit bei den Methylenpeptiden nur die Urethangruppe zur Amid II-Absorption bei 1500 cm^{-1} beiträgt. Die von Cardinaux (8) beobachtete Verschiebung der Amid I Absorption von 1660 cm^{-1} bei den Peptidestern

nach 1690 cm^{-1} bei den Imidazolidinonen ist bedingt durch das Auftreten der zusätzlichen Lactambande. Diese lässt sich bei unseren Methylenpeptiden bei 1705 cm^{-1} getrennt von den übrigen Carbonylabsorptionen (Ester, Urethan, Amid) feststellen.

Tabelle der IR - Daten:

	<u>Z-Gly-Phe-Asx-OBut</u>	<u>CHH</u> <u>Z-Gly-Phe-Asx-OBut</u>
3420 cm^{-1}	(NH) Amid, Urethan	(NH) stark verringert*
3340	(NH)	----
1705	----	(CO) Lactam
1670	(CO Amid I) zwei sek.Amidgr.	stark verringert*, da nur eine tert.Amidgr.
1500	(CONH Amid II) zwei sek.Amidgr.	stark verringert*, da nur eine Urethangr.
1455	----	2 zusätzliche starke
1430		Banden

(* in Bezug auf die Carbonylabsorption bei 1735 cm^{-1} (Ester) und 1725 cm^{-1} (Urethan), Asx = Ala, Val resp. Phe
Alle Spektren in Methylenchlorid aufgenommen, $c=0,06\text{ Mol/l}$

Im NH-Bereich bei 3420 cm^{-1} zeigen die Methylenpeptide gegenüber ihren Vergleichspeptiden ebenfalls eine geringere Absorption, bedingt durch nur eine Urethangruppe (Vergleichspeptide: 2 Amidgruppen, 1 Urethangruppe). Die bei den Referenzpeptiden vorhandene Bande bei 3340 cm^{-1} fehlt vollständig (vgl. Fig. III).

Die IR-Spektren der unverbrückten Peptide (vgl. Teilspektrum Fig. IV) zeigen, dass sich die Lage des Absorptionsmaximums der Bande bei 3340 cm^{-1} mit der Konzentration

Die Abb. 11 zeigt das IR-Spektrum des Polymeren (in CH_2Cl_2) im Bereich 3500 bis 3000 cm^{-1} . Die Kurve ist in zwei Teile unterteilt: Der linke Teil zeigt das Spektrum bei einer Konzentration von 0,1 g/l, der rechte Teil bei einer Konzentration von 0,2 g/l. Die Kurven sind mit einer gestrichelten Linie (—) und einer durchgezogenen Linie (—) dargestellt.

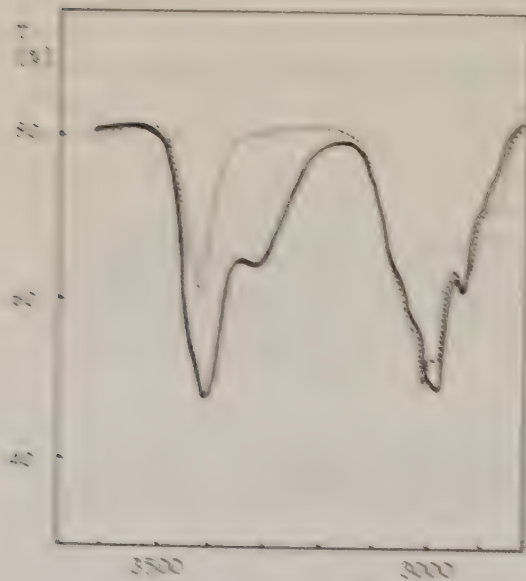


Abb. 11: IR-Spektrum (in CH_2Cl_2)

(—) 0,1 g/l Polymer

(---) 0,2 g/l Polymer



Abb. 12: IR-Spektrum (in CH_2Cl_2)

(—) 0,1 g/l Polymer

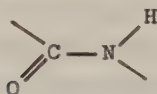
(---) 0,2 g/l Polymer

(- · - ·) 0,3 g/l Polymer

(· · · ·) 0,4 g/l Polymer

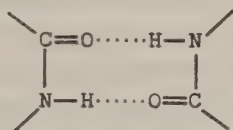
Diese Konzentrationsabhängigkeit deutet auf das Vorliegen von intermolekularen Wasserstoffbrücken hin, da bei grösserer Konzentration die intermolekulare Wasserstoffbrückenbildung zweifellos zunimmt und somit größere

intensivere Absorptionsbanden bei tieferen Schwingungsfrequenzen zu erwarten sind. Bei dieser Konzentrationsänderung bleibt die Bande bei 3420 cm^{-1} unverändert. Das Auftreten der beiden Banden kann den Formen (a) und (b) zugeschrieben werden:



(a)

3420 cm^{-1}



(b)

$3290-3340\text{ cm}^{-1}$

Dass selbst bei der geringen Konzentration von 0,05 % Peptid in CH_2Cl_2 noch sichtbare Absorption bei 3340 cm^{-1} auftritt, deutet neben der intermolekularen Wasserstoffbrückenbildung zusätzlich auf das Vorliegen von intramolekularen Wasserstoffbrücken hin. Im Falle von Z-Gly-Phe-Ala-OBut etwa zwischen der Carbonylgruppe des Glycins und der NH-Gruppe des Alanins.

Das Auftreten von intramolekularen, intermolekularen sowie nichtverbrückten Amid-Protonen diskutierte bereits Shield (37) bei Tripeptiden. Dabei bestätigte er anhand der Temperatur- und Konzentrations-Abhängigkeit der IR-Banden von Amid, dass das Vorliegen von Tripeptiden in dimeren Komplexen auf die Wasserstoffbrückenbildung zurückzuführen sei, wie dies Schwyzer (38) und Rees (39) bereits früher postuliert hatten.

Das Vorliegen von Dimeren, intra- oder intermolekularen Wasserstoffbrücken ist im Falle der N,N'-Methylenpeptide auf Grund der fehlenden Amidprotonen auszuschliessen.

So ergeben sich auch aus den IR-Spektren keinerlei Hinweise auf Wasserstoffbrückenbildungen. Neben den vor- gängig geschilderten Unterschieden im NH- und Amid I u. II Bereich zeigen Alkylidenpeptide gegenüber ihren Vergleichs- peptiden 2 intensive Zusatzbanden bei 1455 und 1430 cm^{-1} . Zehavi (2) bestätigt das Auftreten zusätzlicher Banden bei allen untersuchten 4- Imidazolidinonen bei 1420- 1430 cm^{-1} (in CHCl_3) ohne eine Erklärung dafür zu geben. Diese Banden finden sich auch bei den N-terminalen Alkylidenpeptidestern und bei den deblockierten N,N'- Methylentripeptiden.

Die skizzierten Veränderungen im IR der Imidazolidinon- peptide gegenüber ihren Vergleichspeptiden können bei kleinen Peptiden als schlüssige Hinweise auf die Imidazoli- dinonstruktur dienen. Bei grösseren Peptiden lassen sich die Auswirkungen der Imidazolidinonstruktur weitaus schlechter beobachten, da Veränderungen in einem Teil- bereich die Gesamtaborption, z. B. der Amidgruppen, nur unwesentlich beeinflusst und sich dadurch der Beobach- tung entzieht.

5.1.4 NMR - Spektren

Obwohl das Phänomen der kernmagnetischen Resonanz erst 1946 entdeckt wurde, erkannte man die enorme Leistungsfähigkeit dieser Methode für die organische Chemie sehr schnell. Auch in der Peptidchemie findet die NMR-Spektroskopie immer häufigere Anwendung. Da sie erlaubt, die Anzahl, Art und Umgebung der auftretenden Protonen zu bestimmen, ist sie vor allem zur Klärung von Strukturproblemen geeignet. Die relativ grosse Protonenzahl schon bei kleinen Peptiden setzt ihrer Anwendung und Leistungsfähigkeit allerdings Grenzen.

5.1.4.1 N-terminale Alkylidenpeptidester und entsprechende Vergleichspeptidester

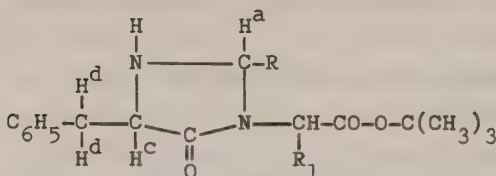
Das Imidazolidinon $\begin{array}{c} |CHH| \\ \text{Phe-Ala-OBut} \end{array}$, gelöst in DMSO- d_6 , zeigt im NMR-Spektrum die Signale sämtlicher Protonen des entsprechenden Dipeptidesters Phe-Ala-OBut mit Ausnahme des Amid- und eines Aminprotons. Zusätzlich findet man jedoch ein Singulett bei $\delta = 4,7$ ppm entsprechend zwei Protonen, den Methylenprotonen. Vergleiche mit NMR-Spektren ähnlicher Substanzen ermöglicht uns Edward (22). Für 1- bzw. 3-Alkyl-derivate von 5,5-Diphenyl-4-imidazolidinon findet er für die C-2 Protonen Singuletts bei $\delta = 4,1-4,4$ ppm. Acylierungen in 1- bzw. 3-Stellung verschieben diese Signale bis zu 1,2 ppm nach tieferem Feld.

Während bei unseren Methylenpeptiden $\begin{array}{c} |CHH| \\ \text{Phe-Ala-OBut} \end{array}$ und $\begin{array}{c} |CHH| \\ \text{Phe-Val-OBut} \end{array}$ und bei den einfachen 4-Imidazolidinonen von Edward die beiden Protonen in 2-Stellung des Rings stets als Singulett auftreten, ergeben sich in den Methylenpeptiden $\begin{array}{c} |CHH| \\ \text{Phe-Leu-OBut} \end{array}$ und $\begin{array}{c} |CHH| \\ \text{Phe-Phe-OBut} \end{array}$ für die Methylenprotonen wesentlich kompliziertere Signale: beim ersteren findet man eine Aufspaltung der beiden Protonen in zwei Dubletts bei $\delta = 4,32$ resp. $4,73$ ppm ($J=9\text{Hz}$), beim letzteren eine Aufspaltung in ein kompliziertes Multiplett bei $\delta = 4,5 - 5,0$ ppm (vgl. Abschnitt 5.1.4.2)

Eine Aufspaltung der Methylenprotonen um $0,47$ ppm fand auch Cardinaux (8) bei seinem Methylen-tetrapeptidester $\begin{array}{c} |CHH| \\ \text{Pro-Leu-Glu(OBut)-Phe-OBut} \end{array}$.

Das Aethylidenderivat $\begin{array}{c} | \text{CHR} | \\ \text{Phe-Ala-OBut} \end{array}$ ($\text{R}=\text{CH}_3$), gelöst in DMSO-d_6 , zeigt gegenüber dem Dipeptidester zwei zusätzliche Signale: man findet ein Dublett bei $\delta = 1,45 \text{ ppm}$ (CDCl_3 $\delta = 1,43 \text{ ppm}$) entsprechend drei Protonen, sowie ein Quadruplett bei $\delta = 5,02 \text{ ppm}$ (CDCl_3 $\delta = 5,25 \text{ ppm}$) entsprechend einem Proton. Die Kopplungskonstante beträgt für beide Signale 7 Hz.

Tabelle der NMR - Daten der Imidazolidinondipeptidester



$\text{R} = \text{H}^a$

$\text{R} = \text{CH}_3^b$

	$\text{H}^a, \text{CH}_3^b$	H^c	H^d
$\begin{array}{c} \text{CHH} \\ \text{Phe-Ala-OBut} \end{array}$	4,7 (s)	4,65(t)6Hz	3,25(d)6Hz
$\begin{array}{c} \text{CHH} \\ \text{Phe-Val-OBut} \end{array}$	4,78(s)	4,23(t)6Hz	3,4 (d)6Hz
$\begin{array}{c} \text{CHH} \\ \text{Phe-Leu-OBut} \end{array}$	4,32(d) 9Hz 4,73(d) 9Hz	4,7 (t)6Hz	3,35
$\begin{array}{c} \text{CHH} \\ \text{Phe-Phe-OBut} \end{array}$	4,7 (m)	4,7	3,1
$\begin{array}{c} \text{CHR} \\ \text{Phe-Ala-OBut} \end{array}$	5,02(qa)7Hz 1,45(d) 7Hz	4,38(t)6Hz	3,22(d)6Hz
$\begin{array}{c} \text{CHR} \\ \text{Phe-Val-OBut} \end{array}$	5,04(qa)7Hz 1,62(d) 7Hz	4,3	3,44(m)
Phe-Ala-OBut		3,5(X)	2,86(ABX)
Phe-Val-OBut		3,6(X)	2,93(ABX)

(Alle Spektren in DMSO-d_6)

5.1.4.2 Geschützte und deblockierte N,N'-Methylenetripeptide und entsprechende Vergleichspeptide

Bei unseren N,N'-Methylenetripeptiden finden wir für die Methylenprotonen eine Aufspaltung in zwei Dubletts ($J=9\text{Hz}$). Diese Aufspaltung ergibt sich aus der unterschiedlichen Abschirmung der C-2 Methylenprotonen durch den Phenylring der Phenylalaninseitenkette. Dieser Abschirmeffekt bewirkt nicht nur eine Aufspaltung der Methylen- sondern auch der aromatischen Protonen. Die Signale der letzteren treten in den nichtterminalen Methylenpeptiden als Multiplett auf, wobei diese Aufspaltung von der Seitenkette (R) der benachbarten Aminosäure zusätzlich unterstützt wird. In den unverbrückten Vergleichspeptiden finden wir die Signale der aromatischen Protonen stets als Singulett.

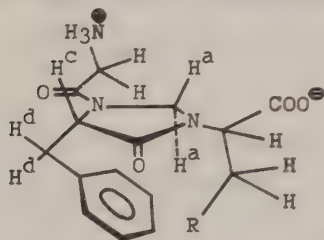


Fig. V

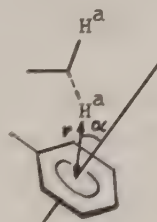


Fig. VI

Da im allgemeinen die Beeinflussung eines angelegten Magnetfeldes im Bereich einer Struktureinheit (z.B. eines Phenylrings) sowohl von der Entfernung (r) als auch vom Winkel (α) abhängig ist (vgl. Fig. VI), wird das Ausmass der Aufspaltung der C-2 Methylenprotonen durch die gegenseitige Lage von Imidazolidinon- und Phenylring bestimmt.

Die Anordnung einer Seitenkette ist generell eine Funktion des gesamten Peptidmoleküls. Aus der Betrachtung der Dreidimensionalen Modelle unserer Tripeptidimidazolidinone geht hervor, dass die Lage der Benzylgruppe des Phenylalanins im Molekül besonders

von der Seitenkette der carboxylständigen Aminosäure (vgl. Fig. V) bestimmt wird. Diese Beobachtung bestätigt sich in den NMR-Spektren anhand der Aufspaltung der C-2 Methylenprotonen: Während die Spektren der beiden Methylentripeptide mit Alanin als C-terminaler Aminosäure (Z-Gly^{|CHH|}-Phe-Ala-OBut resp. Z-Val^{|CHH|}-Phe-Ala-OBut) Methylensignalaufspaltungen von 0,64 resp. 0,86 ppm aufweisen, beträgt sie im Fall des Methylentripeptids mit Valin am C-terminalen Ende nur 0,25 ppm. Die beiden Methylgruppensignale der Valin-Seitenkette werden auf Grund der Wechselwirkung mit dem Phenylring ebenfalls aufgespalten: man findet 2 Dubletts bei $\delta = 0,35$ resp. 0,75 ppm ($J=6\text{Hz}$) entsprechend je 3 Protonen; im unverbrückten Vergleichspeptid tritt nur ein Singulett bei $\delta = 0,8$ ppm, entsprechend 6 Protonen, auf. Sowohl die Protonenresonanzen der Valin- wie der Alanin-Seitenketten sind bei den Methylentripeptiden gegenüber den Vergleichspeptiden nach höherem Feld verschoben.

Ein weiterer Unterschied zwischen Methylentripeptiden und Vergleichspeptiden zeigt sich im Bereich der C-5 Substituenten des Imidazolidinonrings. Bei den Methylentripeptiden gibt die Methylengruppe (H^d) (vgl. Fig. V) im Benzylrest der Phenylalanin-Seitenkette ein ABX-Signal; das α -Proton (H^c) des Phenylalanins zeigt ein 4-Liniensignal. Dieses Aufspaltungsmuster lässt sich mit der diastereotropen Lage der beiden Methylenprotonen (H^d) erklären. Bei den Vergleichspeptiden finden wir für die Methylenprotonen ein Dublett bei $\delta = 3,0$ ppm entsprechend 2 Protonen (H^d), und für das α -Proton (H^c) ein Triplett bei $\delta = 4,8$ ppm. Die Kopplungskonstante beträgt für beide Signale 6 Hz.

Zwischen den NMR-Spektren der geschützten und deblockierten Methylenpeptide besteht kein Unterschied. Die geringen Differenzen der Verschiebungswerte sind eine Folge der verschiedenen Lösungsmittel (geschützte: DMSO- d_6 , deblockierte: D_2O).

Tabelle der NMR-Daten

N,N'-Methylen tripeptide

	H ^a	H ^c	H ^d	
Z-Gly- $\begin{array}{ c } \hline \text{CHH} \\ \hline \end{array}$ -Phe-Ala-OBut	3,77(d) 9Hz 4,63(d) 9Hz	5,0 (X)	3,3 (AB)	CH ₂ (Gly) 3,86(d) 5Hz 4,08(d) 5Hz CH (Ala) 4,7 (qa) 7Hz CH ₃ (Ala) 0,9 (d) 7Hz
Z-Gly- $\begin{array}{ c } \hline \text{CHH} \\ \hline \end{array}$ -Phe-Val-OBut	4,05(d) 9Hz 4,3 (d) 9Hz	5,2 (X)	3,3 (AB)	CH ₂ (Gly) 3,95(d) 5Hz 4,1 (d) 5Hz CH (Val) 4,75 CH (Val) 1,75(m) CH ₃ (Val) 0,35(d) 6Hz 0,75(d) 6Hz
Z-Val- $\begin{array}{ c } \hline \text{CHH} \\ \hline \end{array}$ -Phe-Ala-OBut	4,06(d) 9Hz 4,7 (d) 9Hz	5,1 (X)	3,3 (AB)	CH ₂ (Val) 4,05(d) 6Hz CH (Val) 2,0 (m) CH ₃ (Val) 0,97(d) 6Hz CH ₃ (Ala) 4,68(qa) 7Hz CH ₃ (Ala) 0,9 (d) 7Hz
Gly- $\begin{array}{ c } \hline \text{CHH} \\ \hline \end{array}$ -Phe-Ala	4,07 4,84	4,9 (X)	3,3 (AB)	CH ₂ (Gly) 3,93 CH ₂ (Ala) 4,38(qa) 7Hz CH ₃ (Ala) 0,93(d) 7Hz

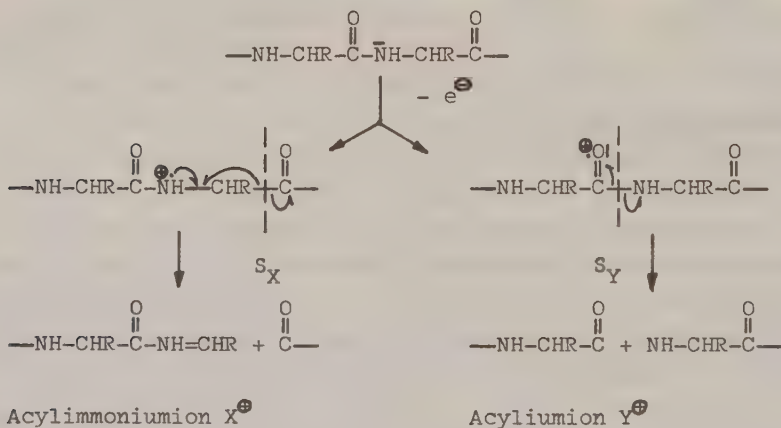
Vergleichstripeptide

	H ^c	H ^d	
Z-Gly-Phe-Ala-OBut	4,8(t) 6Hz	3,1(d) 6Hz	CH ₂ (Gly) 3,82(d) 6Hz CH ₂ (Ala) 4,38(qi) 7Hz CH ₃ (Ala) 1,3 (d) 7Hz
Z-Gly-Phe-Val-OBut	4,8(t) 6Hz	3,0(d) 6Hz	CH ₂ (Gly) 3,82(d) 6Hz CH ₂ (Val) 4,3 (qa) CH (Val) 2,0 (m) CH ₃ (Val) 0,8 (d) 6Hz
Z-Val-Phe-Ala-OBut	4,8(qa) 6Hz	3,1(d) 6Hz	CH (Val) 4,1 (t) CH (Val) 2,0 (m) CH ₃ (Val) 0,8 (d) 7Hz 0,9 (d) 7Hz CH (Ala) 4,35(qi) 7Hz CH ₃ (Ala) 1,3 (d) 7Hz
Gly-Phe-Ala	4,71(X)	3,07(AB)	CH ₂ (Gly) 3,72(s) CH ₂ (Ala) 4,08(qa) 7Hz CH ₃ (Ala) 1,33(d) 7Hz

(Alle Spektren in DMSO-d₆)

5.1.5 MS - Spektren

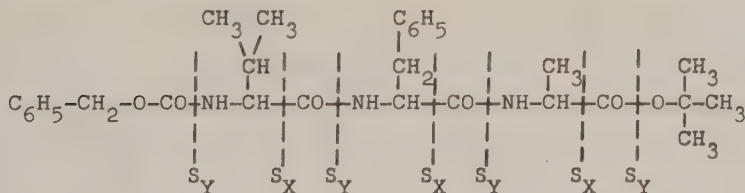
Erst um 1965 begann die umfassende Anwendung der Massenspektrometrie in der Peptidchemie. Seitdem ist ein starkes Anwachsen im Gebrauch dieser physikalischen Methode zu verzeichnen. Mit den heute verfügbaren Geräten kann ein grosser Teil der interessierenden Peptide und Peptidderivate verflüchtigt und der Dampf ionisiert werden. Dabei kann jede Amidbindung durch Elektronenstoss mit ungefähr gleicher Wahrscheinlichkeit, unter Verlust eines Elektrons, positiv geladen werden. Aus dem Massen-Ladungsverhältnis (m/e -Wert) der entstehenden Molekülionen M^+ lässt sich das Molekulargewicht feststellen. Die gebildeten Molekülionen zerfallen in der Folge in kleinere Ionenbruchstücke (Sequenzionen), wobei sich für jede ionisierte Amidbindung zwei Spaltungsmöglichkeiten ergeben:



Die Spaltungen führen entweder zu einem Acylimmoniumion X^+ oder zu einem Acliumion Y^+ und ungeladenen Radikalen.

Acyliumionen Y^+ mit n Aminosäureresten können unter Ausstossung eines CO-Moleküls in das nächst kleinere Acylimmoniumion X^+ übergehen, das seinerseits ein Molekül $R-CH=NH$ abspalten kann, sodass ein kleineres Fragment Y^+ , mit n-1 Aminosäureresten entsteht. Beide Reaktionsschritte zusammen ergeben die Eliminierung eines Aminosäurerestes aus dem Fragment Y^+ . Die Massendifferenzen zwischen den einzelnen Acyliumionen Y^+ entsprechen den Massen der im Peptid aufeinanderfolgenden Aminosäureresten. Dasselbe gilt von der Reihe der Acylimmoniumionen X^+ . Auf Grund dieses schrittweisen Abbaus der Aminosäuren kann die Sequenz von Peptiden ermittelt werden, Weygand (40).

Am Beispiel des unverbrückten Tripeptids Z-Val-Phe-Ala-OBu lassen sich das Molekülion M^+ sowie die Sequenzionen X^+ und Y^+ eindeutig feststellen:

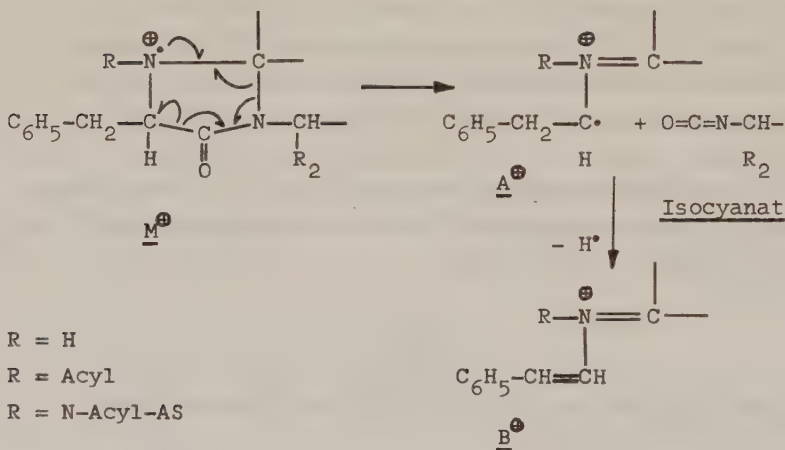


Y^+ :	(135)*	234	381	452	MG: 525,66
X^+ :		206	353	424	M^+ : 525

* tritt nicht auf, sofortige Abspaltung von CO_2
zu m/e 91 ($\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_2^+$)

Das Spektrum wird durch zusätzliche Fragmentierungen kompliziert. Diese ergeben sich hauptsächlich aus Mc-Lafferty-Umlagerungen des tert. Butylesters und der Valinseitenkette. Im ersteren Fall wird ein Molekül C_4H_8 (m/e 56) ausgestossen, im zweiten Fall ein $\text{CH}_3-\text{CH}=\text{CH}_2$ Molekül (m/e 42).

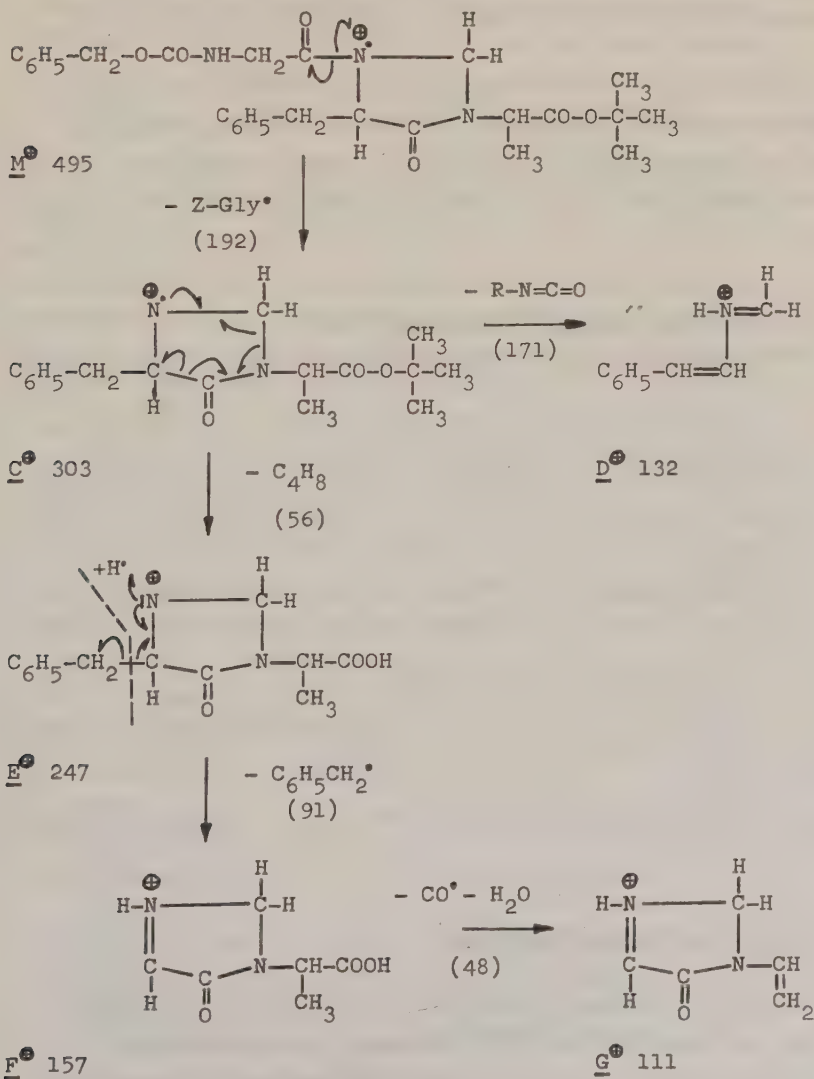
Die MS-Spektren der N,N'-Methylenpeptide zeigen dieselben Sequenzionen wie ihre unverbrückten Referenzpeptide mit Ausnahme der Spaltung der Ringamidbindung (Lactambindung). Dafür kann aber eine für alle Imidazolidinonpeptide typische Fragmentierung beobachtet werden: die Abspaltung eines Isocyanats aus dem Ring.



Diese Abspaltung eines Isocyanatrestes, die erstmals von Edward (22) anhand der bereits erwähnten 5,5-Diphenyl-4-imidazolidinone festgestellt wurde, erlaubt es, die Verknüpfungsstelle des Alkylidenrestes in einem beliebigen Peptid zu ermitteln.

Bei den 1-Acylderivaten (R = Acyl, N-Acyl-AS) zeigen die Fragmente A^+ , B^+ oft nur geringe Intensitäten; die Hauptfragmente D^+ ergeben sich aus einer zusätzlichen Abspaltung der 1-Acylgruppen (s.u.).

Am Beispiel des N,N'-Methylentripeptides Z-Gly^{|CHH|}-Phe-Ala-OBut
möchten wir weitere charakteristische Zerfallsprodukte der
N,N'-Alkylidentripeptide aufzeigen:



Eine Spaltung zwischen dem Imidazolidinonring und dem C-terminalen Restpeptid, wie dies von Cardinaux (8) bei $\begin{array}{c} \text{CHR} \\ | \\ \text{Pro}-\text{Leu}-\text{Glu}(\text{OBut})-\text{Phe}-\text{OBut} \end{array}$ ($\text{R}=\text{CH}_3$) festgestellt wurde, konnte weder bei unseren N,N'-Alkylidentripeptiden noch bei den N-terminalen Alkylidendipeptidestern festgestellt werden.

N,N'-Aethylidenpeptide zeigen in allen Punkten ein den Methylenpeptiden homologes Spektrum (um +14 Masseneinheiten verschoben). Es zeigen sich weder Unterschiede in den Sequenzionen noch in den charakteristischen Zerfallsprodukten.

Tabelle charakteristischer Bruchstücke

	M ⁺	A ⁺	B ⁺	C ⁺	D ⁺	E ⁺	F ⁺	G ⁺
$\begin{array}{c} \text{CHH} \\ \\ \text{Z-Gly}-\text{Phe}-\text{Ala}-\text{OBut} \end{array}$	495	324	323	303	132	247	157	111
$\begin{array}{c} \text{CHH} \\ \\ \text{Z-Gly}-\text{Phe}-\text{Val}-\text{OBut} \end{array}$	523	324	323	331	132	275	185	139
$\begin{array}{c} \text{CHR} \\ \\ \text{Z-Gly}-\text{Phe}-\text{Ala}-\text{OBut} \end{array}$	509	338	337	317	146	261	171	125
$\begin{array}{c} \text{CHH} \\ \\ \text{Phe}-\text{Ala}-\text{OBut} \end{array}$	304	133	132			247	157	111
$\begin{array}{c} \text{CHH} \\ \\ \text{Phe}-\text{Val}-\text{OBut} \end{array}$	332	133	132			275	185	139
$\begin{array}{c} \text{CHR} \\ \\ \text{Phe}-\text{Ala}-\text{OBut} \end{array}$	317	147	146			261	171	125

5.1.6 Optisches Drehvermögen

Eine mögliche Epimerisierung der N-terminalen Aminosäure (Phe) bei der Synthese der Imidazolidinondipeptidester ist unwahrscheinlich, da alle isolierten Imidazolidinonpeptide

aus verschiedenen Syntheseversuchen bei wechselnden Reaktionsbedingungen identische Drehwerte aufwiesen.

Das optische Drehvermögen aller Imidazolidinonpeptide unterscheidet sich beträchtlich von demjenigen der entsprechenden Vergleichspeptide. Während letztere durchwegs kleine spez. Drehwerte (α_D^{20}) aufweisen, bewirkt die Imidazolidinonbildung eine starke Erhöhung der Drehwerte.

Da bei der Imidazolidinonbildung der Methylenpeptide kein zusätzliches asymmetrisches Zentrum in das Molekül eingeführt wird - Die Summe der Drehwerte der einzelnen asymmetrischen Zentren gegenüber den Vergleichspeptiden also nicht verändert wird - muss die Aenderung der spez. Drehwerte hauptsächlich zwei Faktoren zugeschrieben werden:

- Die Imidazolidinonbildung bewirkt eine Fixierung einer oder weniger Konformationen und damit eine Aenderung der Sekundär- und Tertiärstruktur der Peptide.
- Wechselwirkungen der Peptidketten untereinander (Bildung von Assoziaten) oder mit dem Lösungsmittel ändern sich mit der Ringbildung (vgl. Abschnitt 5.2.3)

Tabelle der spez. Drehwerte

	$[\alpha]_D^{20} *$		$[\alpha]_D^{20} *$
Z-Gly- $\begin{array}{c} \text{CHH} \\ \text{Phe} \end{array}$ -Ala-OBut	+ 132°	Z-Gly-Phe-Ala-OBut	- 21°
Z-Gly- $\begin{array}{c} \text{CHH} \\ \text{Phe} \end{array}$ -Val-OBut	+ 97	Z-Gly-Phe-Val-OBut	- 16
Z-Gly- $\begin{array}{c} \text{CHH} \\ \text{Phe} \end{array}$ -Phe-OBut	+ 35	Z-Gly-Phe-Phe-OBut	- 6
Z-Gly- $\begin{array}{c} \text{CHH} \\ \text{Phe} \end{array}$ -Leu-OBut	+ 105	Z-Gly-Phe-Leu-OBut	- 20
Z-Val- $\begin{array}{c} \text{CHH} \\ \text{Phe} \end{array}$ -Ala-OBut	+ 86	Z-Val-Phe-Ala-OBut	- 55

*) alle Werte gemessen in Methanol, c = 0,3

5.2 Chemisches Verhalten

5.2.1 Verhalten beim Abspalten von Schutzgruppen

(vgl. Abschnitt 4.2)

a) Hydrogenolysen

Schutzgruppen vom O-Benzylurethantyp (Z) werden normalerweise mit Wasserstoff über Pd-Kohle in Alkoholen oder Eisessig abgespalten. Wir haben wiederholt festgestellt, dass nichtterminale N,N'-Alkylidenpeptide unter diesen Reaktionsbedingungen, selbst bei erhöhter Temperatur (80°C), über Stunden beständig sind.

b) Acidolysen

Die beiden wichtigen Schutzgruppen t-Butoxycarbonyl (BOC-) und t-Butylester (-OBut) werden zumeist durch Säuren abgespalten. Zur Anwendung gelangen: Salzsäure in Dioxan, Bromwasserstoff in Eisessig und Trifluoressigsäure. Wie bereits erwähnt zeichnen sich die N-terminalen Alkylidenpeptide durch eine erstaunlich gute Beständigkeit im sauren Bereich aus. Die nichtterminalen N,N'-Alkylidenpeptide bleiben bei der Abspaltung der t-Butylestergruppe mit TFA, selbst bei erhöhter Temperatur (50°C), unverändert.

c) Hydrazinolysen

Die Abspaltung der Phtalylgruppe aus N-Phtalylpeptiden geschieht meist durch Erhitzen des Peptids mit Hydrazin-Hydrat in alkoholischer Lösung. Das entstehende Zwischenprodukt wird sodann durch Erhitzen mit verdünnter Mineralsäure in Phtaloylhydrazin und Peptid gespalten.

Boissonnas (41) empfiehlt eine modifizierte Methode unter Verwendung von Phenylhydrazin und einer tert. Base als Katalysator. Wie bereits geschildert zerfallen N-terminale Methylen- und Aethylidendipeptidester in alkoholischer Lösung beim Erwärmen auf 60°C langsam zum Dipeptidester (vgl. Abschnitt 2.3.1). Durch Zugabe von Phenylhydrazin wird diese Zerfallsreaktion merklich beschleunigt, da die entstehende Carbonylkomponente als Phenylhydrazon abgefangen wird. Bei der Verwendung von 2,4-Dinitrophenylhydrazin können die entstandenen Hydrazone im DC nachgewiesen werden.

Nichtterminale Alkylidenpeptide werden unter den obigen Reaktionsbedingungen nicht angegriffen. So lässt sich aus Pht-Gly- $\begin{array}{c} | \\ \text{CHH} \end{array}$ -Phe-Ala-OH die Phtalylgruppe mit Phenylhydrazin abspalten, ohne dass dadurch der Imidazolidinonring verändert wird. Das resultierende $\begin{array}{c} | \\ \text{CHH} \end{array}$ -Gly-Phe-Ala ist identisch mit demjenigen, das aus Z-Gly- $\begin{array}{c} | \\ \text{CHH} \end{array}$ -Phe-Ala-OH durch Hydrogenolyse erhalten wird.

5.2.2 Totalhydrolyse

Unter den Bedingungen der sauren Totalhydrolyse werden N,N'-Alkylidentripeptide ebenso wie ihre unverbrückten Analoga in die jeweiligen Aminosäuren gespalten. Werden z.B. das Methylenpeptid Gly- $\begin{array}{c} | \\ \text{CHH} \end{array}$ -Phe-Ala und das Vergleichs-peptid Gly-Phe-Ala in 6N HCl im Hydrolysebad während 24 h auf 120°C erhitzt und die Reaktionslösungen anschließend chromatographiert, so erhält man für beide Peptide identische Chromatogramme.

5.2.3 DC - Verhalten

Auf Grund des direkten chromatographischen Vergleichs nichtterminaler Methylenpeptide mit ihren Vergleichs-peptiden lassen sich folgende Feststellungen treffen:

- die geschützten Alkylidenpeptide sind unpolarer als die entsprechenden Vergleichspeptide. So weisen die Methylenpeptide Z-Gly $\begin{array}{c} | \\ \text{CHH} \\ | \end{array}$ Phe-Ala-OBut, Z-Gly $\begin{array}{c} | \\ \text{CHH} \\ | \end{array}$ Phe-Val-OBut und Z-Val $\begin{array}{c} | \\ \text{CHH} \\ | \end{array}$ Phe-Ala-OBut einen um durchschnittlich 0,2 Einheiten grösseren R_F -Wert auf als ihre Referenzpeptide. Ursache dieses Unterschiedes ist die Zahl polarer NH-Gruppen.
- deblockierte nichtterminale Alkylidenpeptide zeigen nach DC polarere Eigenschaften als die unverbrückten Analoga. Diese zunächst überraschende Feststellung lässt sich mit den unterschiedlichen Hydratisierungsmöglichkeiten erklären. Die Vergleichspeptide sind sowohl zur intra- als auch zur intermolekularen Wasserstoffbrückenbildung befähigt (zwischen NH- und CO-Gruppen, vgl. auch Abschnitt 5.1.3). Die daraus resultierenden Molekülanordnungen oder Molekülverbände (Dimere) lassen sich weniger gut hydratisieren als die monomeren nicht-terminalen N,N'-Alkylidenpeptide.

R_F -Werte (r)

	r	FM*		r	FM*
Z-Gly $\begin{array}{c} \\ \text{CHH} \\ \end{array}$ Phe-Ala-OBut	0,75	a	Gly $\begin{array}{c} \\ \text{CHH} \\ \end{array}$ Phe-Ala	0,28	b
Z-Gly-Phe-Ala-OBut	0,58	a	Gly-Phe-Ala	0,36	b
Z-Val $\begin{array}{c} \\ \text{CHH} \\ \end{array}$ Phe-Ala-OBut	0,82	a	Val $\begin{array}{c} \\ \text{CHH} \\ \end{array}$ Phe-Ala	0,36	b
Z-Val-Phe-Ala-OBut	0,64	a	Val-Phe-Ala	0,44	b

(* FM = Fließsmittel, vgl. Abschnitt 7.1)

5.2.4 Enzymatischer Abbau

Die Einführung der N,N'-Alkylidengruppe ermöglicht eine Einflussnahme auf die enzymatische Spaltbarkeit einer Peptidbindung. Während unsere deblockierten, unverbrückten Vergleichstripeptide mit verschiedenen Enzymen in Aminosäuren und Dipeptidfragmente gespalten werden, sind die N,N'-Methylenderivate dieser Tripeptide gegen einen proteolytischen Abbau durch Enzyme resistent.

Schon früher ist versucht worden, durch Substitution am Amid-N, Peptidbindungen vor einem proteolytischen Angriff durch Enzyme zu schützen. Erstmals wurde eine solchermaßen gezielte Modifikation von Oxytocin hergestellt. Die Inaktivierung des Oxytocins im Organismus erfolgt nämlich unter Spaltung der Bindung zwischen dem N-terminalen Cysteyl- und dem folgenden Tyrosylrest. Boissonnas (42) sowie Rudinger (43) hatten deshalb (N-Methyl-Tyr⁸)-Oxytocin synthetisiert. Da aber die oxytocische Aktivität dieses Derivats nur noch gering ist, fand das Produkt keine weitere Verwendung.

Bei unseren Enzymversuchen wurden Carboxypeptidase A (CPA), Aminopeptidase M (APM), α -Chymotrypsin und Pronase P zur Spaltung von Gly-Phe-Ala, Gly-Phe-Val resp. Gly-Phe-Ala und Gly-Phe-Val verwendet: man löst das Peptid in einem geeigneten Puffer, gibt das Enzym dazu und verfolgt die Reaktion, die bei 40°C durchgeführt wird, mittels DC. Die Auswertung der Chromatogramme führt zu folgenden Resultaten:

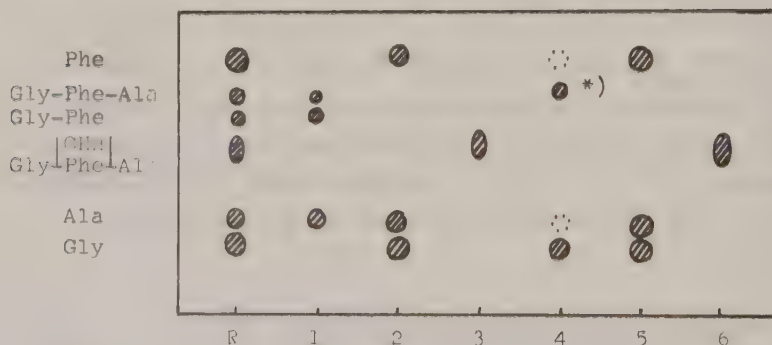
- CPA und APM spalten die unverbrückten Tripeptide in weniger als 48 h komplett in die jeweiligen Aminosäuren auf, wobei bei der CPA-Spaltung schon nach 4 h mehrheitlich die C-terminale Aminosäure und das Dipeptid-

fragment Gly-Phe auftreten. Das DC des APM-Versuchs zeigt nach 1 h kein Tripeptid (Gly-Phe-Ala) mehr an.

- Pronase P spaltet das Peptid Gly-Phe-Val zwischen Phe und Val. Nach 4 h finden wir ausschliesslich Val und Gly-Phe. Letzteres wird von Pronase P nicht weiter gespalten; selbst nach 24 h zeigt das DC nur Spuren von Gly und Phe.
- α -Chymotrypsin spaltet beide Amidbindungen des Gly-Phe-Ala resp. Val-Phe-Ala. Die Spaltung ist allerdings so langsam, dass nach 96 h noch mehrheitlich das Tripeptid vorhanden ist.
- Nichtterminale N,N'-Methylentripeptide werden von keinem der oben erwähnten Enzyme gespalten. Sie konnten aus allen Versuchen unverändert zurückgewonnen werden.

DC der Enzymversuche mit CPA und APM

(FM e, Laufstrecke 12 cm, vgl. Abschnitt 7.1)



R: Kontroll-AS u. Peptide

1: Gly-Phe-Ala 4 h, CPA

2: Gly-Phe-Ala 48 h, CPA

3: Gly-Phe-Ala 96 h, CPA

4: Gly-Phe-Ala 1 h, APM

5: Gly-Phe-Ala 48 h, APM

6: Gly-Phe-Ala 96 h, APM

*) Phe-Ala

EXPERIMENTELLER TEIL

6. ALLGEMEINES

Schmelzpunkte wurden auf einem Koflerblock bestimmt und sind unkorrigiert

Elementaranalysen führte Herr. E. Thommen im Mikrolabor des Institutes für Organische Chemie aus.

IR-Spektren wurden auf einem Spektrographen BECKMAN IR-8 und einem PERKIN-ELMER PE 177-Spektrophotometer aufgenommen.

NMR-Spektren wurden auf einem VARIAN EM-360 Spektrometer (60 MHz) aufgenommen. 90 MHz-Untersuchungen ermöglichte und Herr K. Aeferter auf einem BRUKER 90-WH-Spektrometer im Spektrallabor des Institutes für Organische Chemie.

Massenspektren verdanken wir Herr P. Raas (Institut für Phys. Chemie) und Dr. H. Hürzeler (Phys. Abt. der CIBA-GEIGY AG, Basel).

CD-Spektren ermöglichten uns Prof. Dr. Engel und Dr. Heyn im Biozentrum der Universität Basel. Die Aufnahmen erfolgten auf einem CARY 61-CD-Spektrometer.

UV-Spektren wurden auf einem Spektrophotometer BECKMAN Model 25 aufgenommen.

Drehungen wurden auf einem Polarimeter PERKIN-ELMER 141 gemessen.

Allen genannten Herren möchten wir für ihr Entgegenkommen und für die sorgfältige Durchführung der Untersuchungen bestens danken.

7. METHODEN

7.1 Dünnschichtchromatographie (DC)

Alle Arbeiten wurden auf DC-Fertigplatten Kieselgel 60 F 254 der Firma Merck ausgeführt. Zur besseren Reproduzierbarkeit der Trennungen werden die Platten über einer gesättigten Lösung von Calciumchlorid klimatisiert.

Fliessmittel (Gemische in Volumteilen)

- a CH_2Cl_2 -EtOH (96:4)
- b n-BuOH-Eisessig-Wasser (4:1:1)
- c CHCl_3 -MeOH (4:1)
- d CHCl_3 -Aceton (4:1)
- e Essigester-n-BuOH-Eisessig-Wasser (2:2:1:1)
- f n-BuOH-Pyridin-Eisessig-Wasser (45:30:9:36)
- g Petroläther-Aether (7:3)

Der R_F -Wert r einer Substanz im Fliessmittel (FM) a wird mit a/r angegeben. Alle zitierten R_F -Werte sind nur als Anhaltspunkte aufzufassen. Sie sind nur unter exakt standardisierten Bedingungen reproduzierbar.

Revelation

- UV: Fluoreszenzlöschung im UV-Licht von 254 nm.
 - NHR: Besprühen mit Ninhydrinreagens und Erwärmen im Heizschrank (5-10 Min. bei 120°C). Reagens nach Stahl (44).
 - CTR: Chlor-Tolidin Reaktion nach Stahl (44).
- N-term. Alkylidendipeptidester werden durch NHR(5 Min. 100°C)

nicht relliert; erst längeres Erwärmen (10 Min. bei 120°C) macht sie sichtbar.

N-Phtalyl-tripeptid-imidazolidinone lassen sich durch CTR nicht mehr anfärben; einige Minuten nach der Behandlung mit CTR treten sie jedoch als blassgelbe Flecken auf grau-blauem Grund hervor.

7.2 Dickschichtchromatographie

Sie erfolgt auf Kieselgel-G-Schichten MERCK mit Zink-silikat als Fluoreszenzindikator. Nach der Entwicklung mit Kammersättigung erfolgt die Revelation mittels UV. Die Elution der gewünschten Peptide vom Kieselgel einer bestimmten Zone erfolgt mit CHCl_3 -MeOH (2:1).

7.3 Säulenchromatographie

Lösungsmittel: Die Elution der Peptide und Peptidimidazolidinone vom Kieselgel erfolgt mit Methylenchlorid, welches 1-5 % (v/v) EtOH enthält. Handelsübliches Methylenchlorid wird über Nacht mit Calciumchlorid geschüttelt, filtriert und destilliert. 10 Proz. Vor- und Nachlauf werden abgetrennt.

Anordnung: Eine Dosierpumpe fördert das Elutionsmittel mit konstanter Geschwindigkeit auf ein Chromatographierohr, welches eine Füllung von Kieselgel enthält. Das Eluat durchfließt eine UV-Messzelle (254 nm) UVICORD LKB und wird in einem Fraktionenkollektor aufgefangen. Ein Kompensations-schreiber zeichnet den zeitlichen Verlauf der UV-Absorption des Eluats auf und markiert die Fraktionenwechsel.

Ausführung: Das Chromatographierohr wird mit einer Aufschlammung von 50 g Kieselgel MERCK in 100 ml Methylenchlorid beschickt und in der obigen Anordnung mit ca. 200 ml des zur Anwendung gelangenden Elutionsmittels gewaschen. Sodann werden 100-500 mg Substanz, in möglichst wenig Methylenchlorid gelöst, aufgetragen und mit ca. 3 ml/Min. eluiert. Der Gang der Auftrennung wird durch die UV-Absorptionsmessung verfolgt. Ueberdies werden Proben der Fraktionen mittels DC untersucht. Fraktionen gleicher Zusammensetzung werden vereinigt, am Vakuum eingedampft und am Hochvakuum getrocknet.

7.4 Hydrolyseversuche

7.4.1 Hydrolyse der N-term. Imidazolidinonpeptide

Lösungen von je 5 mg Peptidimidazolidinon in Wasser-Alkohol-Gemischen (3 ml, Alkoholgehalt je nach Löslichkeit des Peptids zwischen 10-90 %) werden mit 0,1 N HCl und Universalpuffer nach Britton und Robinson (45) auf pH-Werte zwischen pH 1-10 gepuffert, wobei der pH um jeweils 0,5 Einheiten erhöht wird. Der Hydrolyseverlauf - bei ZT, 60°C resp. 100°C - wird mittels DC anhand der Zunahme der entstehenden Hydrolyseprodukte verfolgt. Dazu werden in Abständen von 10-20 Min. Proben der Reaktionslösungen (2 l) mit Standardlösungen an entsprechenden Dipeptidestern, Aminosäuren resp. Aminosäureestern chromatographisch verglichen. Zur Auftrennung der Imidazolidinon-, Peptid- resp. Aminosäureester wird Fließmittel a verwendet, zur Auftrennung der freien Aminosäuren Fließmittel e. Die Revelation erfolgt mit UV resp. NHR.

7.4.2 Totalhydrolyse

5 mg Peptid werden in 2 ml 6 N HCl gelöst und im Hydrolysebad während 24 h auf 120°C erhitzt. Die Reaktionslösung wird zur Trockene verdampft und der Rückstand in ca. 0,5 ml Wasser aufgenommen. Proben dieser Lösung (2 l) und von Lösungen authentischer Aminosäuren werden mittels DC verglichen.

Revelation: UV resp. NHR.

R _f :	Gly	e/0,11	Val	e/0,25	Phe	e/0,40
	Ala	e/0,15	Leu	e/0,36		

7.5 Nachweis der Carbonylkomponenten durch Vergleich der 2,4-Dinitriphenylhydrazone

Reagens: 0,25 g 2,4-Dinitrophenylhydrazin im 0,6ml 6N HCl gelöst und mit 25 ml MeOH verdünnt.

Ca. 1 mg des Peptids wird mit 0,1 ml Reagens in der Kapillare während 60 Min. auf 100°C erhitzt. Proben (2 l) dieser Lösung, des Reagens, sowie von Lösungen authentischer DNPH werden mittels DC verglichen.

Revelation: - UV

- 0,2-proz. K₃(Fe(CN)₆) in 2N HCl
(blaue Flecken)

R _f :	Reagens am Start	
	CH ₂ O-DNPH	g/0,24
	CH ₃ CHO-DNPH	g/0,32
	C ₆ H ₁₁ O-DNPH	g/0,59

7.6 Titrationen der N-term. Imidazolidinonpeptide - pK - Bestimmung

7.6.1 pK - Bestimmung aus dem Hydrolysegrad des Imidazolidinon-Hydrochlorids

Durch pH-Messung einer wässrigen Lösung mit bekannter Konzentration an Imidazolidinon-Hydrochlorid (c_0 in Mol/l) lässt sich der pK_a -Wert des Imidazolidinons nach folgender Gleichung berechnen:

$$pK_a = 2 \text{ pH} + \log (c_0 - [H^+])$$

Gemessene pH-Werte und daraus berechnete pK_a -Werte der N-terminalen Imidazolidinonpeptid-Hydrochloride:

	pH	c_0	pK_a
$[CHH]$ Phe-Ala-OBu ³ HCl	2,51 2,67	$4 \cdot 10^{-2}$ Mol/l $2 \cdot 10^{-2}$ Mol/l	3,59 3,59
$[CHR]$ (R=CH ₃) Phe-Ala-OBu ³ HCl	2,65	$4 \cdot 10^{-2}$ Mol/l	3,85
$[CRR]$ (R,R'=(CH ₂) ₅) Phe-Ala-OBu ³ HCl	2,56	$4 \cdot 10^{-2}$ Mol/l	3,69
Phe-Ala-OBu ³ HCl	4,73	$4 \cdot 10^{-2}$ Mol/l	8,06

7.6.2 Titration der freien Imidazolidinone in 60-proz.Dioxan

Auf einem Potentiographen METROHM E-336 werden ca. 30 mg Peptidimidazolidinon in einer 60-proz. Dioxan-Lsg. (9 ml Dioxan, 5 ml Wasser, 1 ml ges. KCl-Lsg.) mit einer wässrigen $2,35 \cdot 10^{-2} \text{ N HClO}_4$ -Lsg. unter Verwendung einer Glaselektrode bis zum Halbtitrationspunkt (in Wasser: $\text{pH} = pK_a^{(H_2O)}$) titriert.

Dem so ermittelten pK'_a -Wert in 60-proz. Dioxan lässt sich nach Bjerrum (46) ein pK_a -Wert in Wasser zuordnen, der nach folgender Gleichung berechnet wird:

$$pK_{H_2O} = pK'_{60\% \text{ Dioxan}} + \log y_o$$

Ismailow (47) hat y_o -Werte einiger Lösungsmittel und Lösungsmittelgemische zusammengestellt: für 60-proz. Dioxan gilt $\log y_o \approx 1$.

Eichung der Glaselektrode: mit Puffern der pH-Werte 1,2 und 4 nach Britton-Robinson (45).

	gemessene pK'_a -Werte in 60-proz. Dioxan	berechnete pK_a - Werte in H_2O
$\begin{array}{ c } \text{CHH} \\ \text{Phe-Ala-OBut} \end{array}$	2,28	3,28
$\begin{array}{ c } \text{CHR} \\ \text{Phe-Ala-OBut(R=CH}_3\text{)} \end{array}$	2,63	3,63
$\begin{array}{ c } \text{CRR} \\ \text{Phe-Ala-OBut(RR'=(CH}_2\text{)}_5\text{)} \end{array}$	2,41	3,41
Phe-Ala-OBut	6,94	7,94
m-Chloranilin *)	2,33	3,33

*) Literatur- pK_a -Werte von m-Chloranilin in Wasser:
nach Hall (48) $pK_a = 3,52$
Bell (49) $pK_a = 3,6$

7.6.3 Titration der freien Imidazolidinone in Eisessig

Auf einem Potentiographen METROHM E-336 werden Lösungen der Peptidimidazolidinone ($c = 5 \cdot 10^{-3}$ Mol/l) in Eisessig nach Zugabe von wenig Chinhydron und nach Einführung einer Platinelektrode und einer Ag/AgCl-Referenzelektrode mit einer $2 \cdot 10^{-2}$ N $HClO_4$ -Lsg. (in Eisessig) bis zum Äquivalenzpunkt titriert.

Die Chinhydronелеktrode ($E_0 = + 0,704$ V bei 20°C) besteht aus einem Platindraht, der in eine gesättigte Lösung von Chinhydron, der äquimolaren Verbindung von Chinon ($\text{C}_6\text{H}_4\text{O}_2$) und Hydrochinon ($\text{C}_6\text{H}_4(\text{OH})_2$), eintaucht. An der Elektrode stellt sich folgendes Gleichgewicht ein:



Da das Verhältnis der Konzentrationen des Chinons und des Hydrochinons konstant bleibt, hängt das Elektrodenpotential in Eisessig

$$E = E_0 - 0,059 \text{ p}_{\text{H}_2\text{Ac}^+}$$

nur noch vom $\text{p}_{\text{H}_2\text{Ac}^+}$ der Lösung ab. Im Halbtitrationspunkt gilt:

$$\text{p}_{\text{H}_2\text{Ac}^+} = \text{pK}'(\text{HAc})$$

Durch Vergleich der Halbtitrationspotentiale (HP in mV) resp. der $\text{pK}'(\text{HAc})$ -Werte der Imidazolidinonpeptide mit den entsprechenden Werten einer Referenzsubstanz (m-Chloranilin) mit bekanntem $\text{pK}_a(\text{H}_2\text{O})$ lassen sich scheinbare pK_a -Werte für die Imidazolidinonpeptide in Wasser angeben:

	HP gem.	$\text{pK}'(\text{HAc})$ ber.	$\text{pK}_a(\text{H}_2\text{O})$ ber.
$\begin{array}{ c } \text{CHH} \\ \text{Phe-Ala-OBut} \end{array}$	613 mV	1,545	3,09
$\begin{array}{ c } \text{CHR} \\ \text{Phe-Ala-OBut}(\text{R}=\text{CH}_3) \end{array}$	591	1,915	3,83
$\begin{array}{ c } \text{CRR}' \\ \text{Phe-Ala-OBut}(\text{RR}'=(\text{CH}_2)_5) \end{array}$	604	1,720	3,44
m-Chloranilin	598	1,799	3,6 *)

*) Literatur-Wert für m-Chloranilin: $\text{pK}_a(\text{H}_2\text{O}) = 3,6$, Bell (49)

7.7 Enzymatischer Abbau der deblockierten Tripeptide

Enzyme: Carboxypeptidase A (CPA) aus Rinderpankreas
DFP-behandelt (Serva)

Aminopeptidase M (APM) aus Schweinenieren
(Röhm und Haas)

α -Chymotrypsin vom Rind (Chymotrypsin A₄)(Serva)

Pronase P (Serva)

Pufferlsg.: a 0,02M Na₂HPO₄/KH₂PO₄-Lsg. (8:2) pH 7,5

b 0,02M Na₂HPO₄/KH₂PO₄-Lsg. (7:3) pH 7,15

Man löst 5 mg Peptid in 4 ml Pufferlösung (für Spaltungen mit CPA u. APM verwendet man Puffer a, für Chymotrypsin und Pronase Puffer b) und gibt 0,1 mg Enzym hinzu. Die Hydrolyse erfolgt bei 40°C. Proben (2 l) dieser Lösungen der Blindwerte, sowie von Vergleichslösungen (entsprechende Peptide und Aminosäuren im entsprechenden Puffer) werden direkt chromatographiert unter Verwendung von Fließmittel e. Die Revelation erfolgt mittels UV und NHR.
(vgl. die Resultate in Abschnitt 5.2.4)

8. SYNTHES DER VERGLEICHSPETIDE

8.1 Aminosäure-t-butylester Hydrochloride

Die Aminosäure-t-butylester Hydrochloride werden aus freien Aminosäuren nach Roeske (34) hergestellt.

Man löst 0,1 Mol der Aminosäure in einem Gemisch von 100 ml Dioxan und 10 ml konz. Schwefelsäure, gibt 100 ml flüssiges Isobutylen langsam zu und schüttelt das Reaktionsgemisch in einer Druckflasche während 24 h. Sodann giesst man die klare Lösung in ein eisgekühltes Gemisch von 200 ml EtOAc und 100 ml Wasser und stellt die wässrige Phase mit 2N NaOH auf pH 8 ein. Das Produkt wird 3 mal mit EtOAc extrahiert, die Essigesterphase mit Wasser neutral gewaschen, getrocknet und eingedampft. Das zurückbleibende Öl löst man in wasserfreiem Aether; durch Einleiten von HCl-Gas erhält man das Aminosäure-t-butylester Hydrochlorid als kristalline Ausfällung, die aus EtOH - Aether umkristallisiert wird.

A%	mp. °C	$[\alpha]_D^{20}$ c=2 EtOH	Analyse
Ala-OBu.HCl [1]	58 160 ¹⁾	+ 2°	ber: C 46,28 H 8,88 N 7,71 gef: 46,16 9,10 7,74
Val-OBu.HCl [2]	77 146-148	+21	ber: C 51,55 H 9,61 N 6,69 gef: 51,79 9,70 6,81
Leu-OBu.HCl [3]	64 165-168	+19	ber: C 53,68 H 9,91 N 6,25 gef: 53,83 9,99 6,36
Phe-OBu.HCl [4]	75 170 ¹⁾	+45	ber: C 60,65 H 7,81 N 5,41 gef: 60,83 7,21 5,11

1) Zersetzung

8.2 Z-Dipeptid-t-butylester

Die Z-Dipeptid-t-butylester werden aus Z-Aminosäuren und Aminosäure-t-butylestern (vgl. 8.1) nach der gemischten

Anhydrid-Methode in der Ausführungsform von Tilak (24) hergestellt.

Man löst 0,053 Mol Z-Aminosäure und 5,5 ml (0,05 Mol) NMM in 200 ml DMF, kühlt auf -15°C und gibt 6,5 ml (0,05 Mol) CAIE zu. Nach 12 Min. tropft man dazu eine Lösung von 0,03 Mol Aminosäure-t-butylester Hydrochlorid und 3,3 ml (0,03 Mol) NMM in 100 ml DMF. Nach 4 h bei -15°C zerstört man den Anhydrid-Ueberschuss bei 0°C durch Zutropfen von ges. KHCO_3 -Lsg. bis zu pH ca. 8, rührt 30 Min. bei ZT, nimmt in 600 ml EtOAc auf, wäscht mit ges. KHCO_3 -Lsg., 2N HCl, Wasser und Kochsalzlsg., trocknet den EtOAc-Extrakt und dampft am Vak ein. Das Rohprodukt wird aus EtOAc-Petroläther umkristallisiert.

	A%	mp. $^{\circ}\text{C}$	$[\alpha]_{\text{D}}^{20}$ c=2 EtOH	Analyse
Z-Phe-Ala-OBu[5]	92	98-99	+25 $^{\circ}$	ber: C 67,58 H 7,09 N 6,57 gef: 67,49 7,29 6,57
Z-Phe-Val-OBu[6]	88	96-99	+19	ber: C 68,70 H 7,54 N 6,16 gef: 68,90 7,57 6,20
Z-Phe-Leu-OBu[7]	91	97-98	+26	ber: C 69,20 H 7,74 N 5,98 gef: 69,08 7,67 6,03
Z-Phe-Phe-OBu[8]	82	95-97	+13	ber: C 71,69 H 6,82 N 5,57 gef: 71,82 6,90 5,58

8.3 Dipeptid-t-butylester

Dipeptid-t-butylester werden aus den Z-Dipeptid-t-butylestern (vgl. 8.2) durch Hydrogenolyse nach Bergmann und Zervas (50) hergestellt.

0,1 Mol Z-Dipeptidester werden mit 5 g Pd-Kohle (10-proz.) in 200 ml vorhydriertem Methanol bei ZT hydriert. man filtriert vom Katalysator ab, dampft am Vak zur Trockne ein und kristallisiert das zurückbleibende Öl aus Essigester-Petroläther.

	A%		mp. °C	$[\alpha]_D^{20}$ c=2 EtOH	Analyse
	roh	UK			
Phe-Ala-OBuT [9]	98	72	55-57	-50°	ber: C 65,73 H 8,27 N 9,57 gef: 65,91 8,14 9,55
Phe-Val-OBuT [10]	96	83	67-68	-37	ber: C 67,47 H 8,81 N 8,74 gef: 67,71 9,01 8,82
Phe-Leu-OBuT [11]	94	89	Oel	-46	ber: C 68,38 H 9,00 N 8,38 gef: 68,46 8,97 8,31
Phe-Phe-OBuT [12]	98	77	72-73	- 2	ber: C 71,71 H 7,66 N 7,60 gef: 71,94 7,78 7,63

8.4 Z-Tripeptid-t-butylester

Die Z-Tripeptid-t-butylester werden aus Z-Aminosäuren und Dipeptid-t-butylestern (vgl. 8.3) nach der gemischten Anhydrid-Methode in der Ausführungsform von Tilak (24) hergestellt.

Man löst 11 mMol Z-Aminosäure und 1,1 ml (10 mMol) NMM in 15 ml DMF, kühlt auf -15°C, fügt dazu 1,3 ml (10 mMol) CAIE und nach 12 Min. 5 mMol Dipeptidester in 10 ml DMF. Nach 8 h bei -15°C zerstört man den Anhydrid-Ueberschuss bei 0°C durch Zutropfen von ges. KHCO₃-Lsg. bis zu pH ca. 8, rührt 30 Min. bei ZT, nimmt in 50 ml EtOAc auf, wäscht mit ges. KHCO₃-Lsg., 2N HCl, Wasser und Kochsalz-Lsg., trocknet den EtOAc-Extrakt und dampft am Vakuum ein. Das Rohprodukt wird aus EtOAc-Petrol-äther umkristallisiert.

8.4.1 Carbobenzoxy-glycyl-phenylalanyl-alanyl-t-butylester [13]

Z-Gly-Phe-Ala-OBuT, C₂₆H₃₃N₃O₆, MG 483,58

3,67 g (0,012 Mol) Phe-Ala-OBuT 9 werden mit 0,018 Mol Z-Gly-gem.Anhydrid (aus 4,0 g (0,019 Mol) Z-Gly) bei -10°C während 4 h umgesetzt. 5,75 g (95%) Rohprodukt ergeben nach UK (EtOAc-

Petroläther) 5,3 g (88%) Z-Gly-Phe-Ala-OBu vom mp. 106-107°.

DC : a/0,48, f/0,77 $[\alpha]_D^{20}$: -22° (c=0,3 MeOH)
 IR : (in CHCl₃) 3420, 3340, 2980, 1735, 1725, 1665, 1500
 1370, 1150
 NMR : (in DMSO-d₆, vgl. 5.1.4.2), 1,3(d)7Hz (-CH₃ Ala)/
 1,45(s) (-C(CH₃)₃)/ 3,05(d)6Hz (-CH₂-C₆H₅)/ 3,82(d)
 6Hz (CH₂ Gly)/ 4,38(qi)7Hz (-CH Ala)/ 4,8(t)6Hz
 (-CH Phe)/ 5,1(s) (-CH₂- Z)/ 5,78(t)6Hz (NH Gly)/
 6,85(d)7Hz (NH Ala)/ 7,1(d)7Hz (NH Phe)/ 7,2(s)
 (C₆H₅ Z)/ 7,35(s) (C₆H₅ Phe)
 UV : vgl. 5.1.1
 MS : (vgl. 5.1.5) 483 (M⁺), 427, 410, 382, 339, 319, 311,
 274, 235, 231, 221, 220, 210, 203, 175, 146, 131, 120,
 108, 107, 104, 103, 91, 79, 77, 65, 56.
 Analyse: ber: C 64,58 H 6,88 N 8,69
 gef: 64,59 6,85 8,52

8.4.2 Tabelle weiterer Z-Tripeptid-t-butylester

Schmelzpunkte und opt. Drehwerte sind in der Tabelle p 59 zusammengestellt. UV-, IR- und NMR-Daten finden sich in den Abschnitten 5.1.1, 5.1.3 und 5.1.4.2.

	A%	DC	Analyse
Z-Gly-Phe-Val-OBu [14]	89	a/0,49	ber: C 65,73 H 7,29 N 8,21 gef: 65,84 7,41 8,20
Z-Gly-Phe-Leu-OBu [15]	94	a/0,52	ber: C 66,26 H 7,48 N 7,99 gef: 66,09 7,39 8,04
Z-Gly-Phe-Phe-OBu [16]	95	a/0,55	ber: C 68,67 H 6,66 N 7,51 gef: 68,91 6,74 7,62
Z-Val-Phe-Ala-OBu [17]	82	a/0,61	ber: C 66,26 H 7,48 N 7,99 gef: 66,11 7,62 7,93

8.5 Freie Tripeptide

8.5.1 Methoden zu Schutzgruppenabspaltung

8.5.1.1 Abspaltung der t-Butylgruppe

Man löst 5 mMol Z-Tripeptid-t-butylester (8.4) in 20 ml TFA, lässt 30 Min. bei ZT stehen, engt am Vak ein und tropft die dickflüssige TFA-Lösung in 100 ml eisgekühlten, wasserfreien Aether ein. Die ausgefällte Säure wird abfiltriert und am Vak getrocknet. Sie kann aus MeOH-Aether umkristallisiert werden. Meist wird sie jedoch ohne UK direkt zur Hydrogenolyse (8.5.1.2) eingesetzt. Unterbleibt beim Eintropfen in Aether eine Ausfällung, so wird die TFA am Vak nach Zusatz von 2 mal 10 ml MeOH als TFA-methylester abgedampft und der Rückstand umkristallisiert.

8.5.1.2 Abspaltung der Carbobenzoxy-Gruppe

5 mMol Z-geschütztes Tripeptid (8.5.1.1) werden mit 1 g Pd-Kohle (10-proz.) in 20 ml vorhydriertem MeOH bei ZT hydriert. Die Vollständigkeit der Hydrierung wird mittels DC (FM: b,f) festgestellt. Man filtriert vom Katalysator ab, dampft am Vak ein und kristallisiert den Rückstand aus MeOH-Wasser um. Eventuell während der Hydrierung auskristallisiertes, freies Peptid wird vor der Abtrennung des Katalysators durch Erwärmen und/oder Zugabe von Wasser wieder in Lösung gebracht.

8.5.2 Glycyl-phenylalanyl-alanin - Gly-Phe-Ala [18]



Aus 3,3 g (6,8 mMol) Z-Gly-Phe-Ala-OBu^t 13 erhält man nach der Abspaltung der t-Butylgruppe mit TFA und UK des Rohproduktes

aus MeOH-Aether 2,8 g (86%) Z-Gly-Phe-Ala-OH vom mp. 148-150°C.
Die Hydrogenolyse von 1,6 g (3,7 mMol) Z-Gly-Phe-Ala-OH mit
0,5 g Pd-Kohle ergibt 1,05 g (91%) Gly-Phe-Ala. Gesamtausbeute
beider Schritte: 78%.

mp. : 227-228°C DC : b/0,36, e/0,34, f/0,39
 $[\alpha]_D^{20}$: -30° (c=0,15 H₂O), -23° (c=2 HAc)
 IR : (in KBr) 3280, 3080, 2980, 2930, 2630, 1660, 1640,
 1600, 1550, 1440, 1250
 NMR : (in D₂O, vgl. 5.1.4.2), 1,33(d)7Hz (-CH₃ Ala)/ 3,07(m)
 (-CH₂-C₆H₅)/ 3,72(s) (-CH₂- Gly)/ 4,08(qa)7Hz (-CH
 Ala)/ 4,71(m) (-CH Phe)/ 7,29(s) (C₆H₅ Phe)
 UV : (vgl. 5.1.1)
 MS : 293 (M⁺), 278, 258, 220, 177, 175, 145, 131, 120,
 117, 103, 91, 77, 72, 65, 58, 44, 32, 28.
 Analyse: ber: C 57,33 H 6,53 N 14,32
 gef: 57,42 6,69 14,32

8.5.3 Tabelle freier Tripeptide

	A%	mp. °C	$[\alpha]_D^{20}$ c=1,7 HAc	DC	Analyse
Gly-Phe-Val [19]	69	249-250	-17°	b/0,42 e/0,43	ber: C 59,80 H 7,21 gef: 60,37 7,32
Gly-Phe-Leu [20]	70	235-237	-15	b/0,45 e/0,48	ber: C 60,87 H 7,51 gef: 61,01 7,72
Gly-Phe-Phe [21]	81	238-240	- 8	b/0,47 e/0,51	ber: C 65,02 H 6,27 gef: 65,10 6,31
Val-Phe-Ala [22]	57	210-214	+19	b/0,44 e/0,46	ber: C 60,87 H 7,51 gef: 60,72 7,62

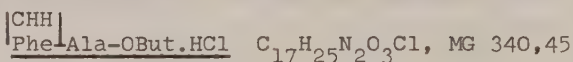
1) A% : Gesamtausbeute nach beiden Abspaltungsschritten.

9. SYNTHESE TERMINALER N,N'-ALKYLIDEN-DIPEPTIDESTER

9.1 N,N'-Methyldipeptid-t-butylester Hydrochloride

34 mMol Dipeptid-t-butylester werden in 100 ml MeOH mit 68 mMol Formaldehyd (5,4 ml 38-proz. Formalinlsg.) versetzt. Nach 2 h bei 100°C dampft man ein und trocknet am Vak. Das gelbe bis gelbbraune Oel löst man in wasserfreiem Aether; durch Einleiten von HCl-Gas erhält man das Methyldipeptid-t-butylester Hydrochlorid als kristalline Ausfällung, die aus i-Propanol-Aether umkristallisiert wird.

9.1.1 N,N'-Methylen-phenylalanyl-alanyl-t-butylester Hydrochlorid [23]



3,67 g (0,012 Mol) Phe-Ala-OBut [9] werden mit 1,9 ml 38-proz. Formalinlsg. (0,025 Mol Formaldehyd) 2 h bei 100°C umgesetzt. Aus 3,9 g Rohprodukt erhält man nach Hydrochloridbildung und UK aus i-Propanol-Aether 3,5 g (86%) Reinprodukt.

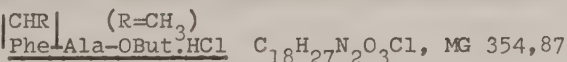
- mp. : 181-183°C $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$: -60° (c=1,8 MeOH)
 DC : a/0,56, c/0,85, d/0,74 UV : vgl. 5.1.1
 IR : (in KBr) 3440, 2980, 2660, 2580, 1730, 1700, 1365, 1235, 1150.
 NMR : (in DMSO-d₆), 1,36(d)7Hz (-CH₃ Ala)/ 1,43(s) (-C(CH₃)₃)/ 3,25(d)6Hz (-CH₂-C₆H₅)/ 4,5(qa)7Hz (-CH Ala)/ 4,65 (t)6Hz (-CH Phe)/ 4,7(s) (N-CH₂-N')/ 7,4(m) (C₆H₅) (vgl. 5.1.4.1)
 MS : 304 (M⁺, -HCl), 247, 231, 213, 203, 175, 157, 149, 132, 120, 111, 91, 79, 77, 65, 57. (vgl. 5.1.5)
 Analyse: ber: C 59,90 H 7,39 N 8,21 Cl 10,45
 gef: 59,72 7,31 8,44 10,76

9.1.2 Tabelle der N,N'-Methyldipeptid-t-butylester Hydrochloride

UV-, NMR- und MS-Daten der folgenden Peptidderivate sind in Tabellen zusammengestellt, vgl. Abschnitte 5.1.1, 5.1.4.1 und 5.1.5.

<u>Methyldi-</u> <u>peptidester</u> <u>Hydrochloride</u>	A%	mp. °C	$[\alpha]_D^{20}$ c=2 EtOH	DC	Analyse
$\begin{array}{ c} \text{CHH} \\ \text{Phe-Val-OBut} \end{array}$ [24]	78	165-167	-80°	a/0,58	ber: C 61,86 H 7,92 gef: 62,06 8,09
$\begin{array}{ c} \text{CHH} \\ \text{Phe-Leu-OBut} \end{array}$ [25]	86	174-176	-63	a/0,64	ber: C 62,73 H 8,16 gef: 62,73 8,27
$\begin{array}{ c} \text{CHH} \\ \text{Phe-Phe-OBut} \end{array}$ [26]	69	170-172	-79	a/0,67	ber: C 66,25 H 7,01 gef: 65,98 6,98

9.2 N,N'-Aethyliden-phenylalanyl-alanyl -t-butylester Hydrochlorid [27]



10 g (34,2 mMol) Phe-Ala-OBut [9] werden in 100 ml 96% EtOH mit 3,84 ml (68,4 mMol) Acetaldehyd (dest., bp. = 20°C) versetzt. Nach 48 h bei ZT dampft man ein und trocknet am Vak. Das rötlich-braune Oel löst man in wasserfreiem Aether; durch Einleiten von HCl-Gas erhält man das Aethylidenpeptid Hydrochlorid als flockige Ausfällung, die, aus i-Propanol-Aether kristallisiert, 5,2 g (43%) reines Hydrochlorid ergibt.

mp. : 163-165°C $[\alpha]_D^{20}$: -78° (C=1,8 MeOH)
 DC : a/0,45, c/0,7, d/0,49-0,54 UV : vgl. 5.1.1
 IR : (in KBr) 3420, 2980, 2640, 2440, 1725, 1705, 1425,
 1375, 1315, 1235, 1155.

NMR : (in DMSO- d_6) 1,33(d)7Hz ($-\underline{\text{CH}}_3$ Ala)/ 1,47(s) ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$)
 1,45(d)7Hz ($\text{N}-\underline{\text{CH}}(\underline{\text{CH}}_3)-\text{N}'$)/ 3,22(d)6Hz ($-\underline{\text{CH}}_2-\text{C}_6\text{H}_5$)/
 4,38(t)6Hz ($-\underline{\text{CH}}$ Phe)/ 4,43(qa)7Hz ($-\underline{\text{CH}}$ Ala)/ 5,02(qa)
 7Hz ($\text{N}-\underline{\text{CH}}(\underline{\text{CH}}_3)-\text{N}'$)/ 7,35(m) (C_6H_5)
 MS : 318 (M^+ , $-\text{HCl}$), 303, 261, 247, 245, 227, 217, 171,
 146, 120, 91, 70, 57, 44, 41, 28. (vgl. 5.1.5)
 Analyse: ber: C 60,92 H 7,66 N 7,89
 gef: 61,06 7,60 7,78

9.3 N,N'-Cyclohexyliden-phenylalanyl-alanyl-t-butylester

Hydrochlorid [28] $\left| \begin{array}{l} \text{CRR}' \\ \text{Phe-Ala-OBut.HCl} \end{array} \right|$ ($\text{RR}' = (\text{CH}_2)_5$) $\text{C}_{22}\text{H}_{33}\text{N}_2\text{O}_3\text{Cl}$ MG 408,93

3 g (10 mMol) Phe-Ala-OBut [9] werden in 100 ml Cyclohexanon
 gelöst und 2 h bei 100°C gehalten. Man dampft am Vak ein, nimmt
 in trockenem Aether auf und fällt das Cyclohexylidenpeptid als
 Hydrochlorid durch Einleiten von HCl-Gas. Nach UK aus i-Propa-
 nol-Aether erhält man 2,4 g (61%) Hydrochlorid, mp. $175-176^\circ\text{C}$.

DC : a/0,6, d/0,67 $[\alpha]_D^{20}$: -36° ($c=1,9$ MeOH)
 IR : (in KBr), 3420, 2920, 2640, 2420, 1735, 1705, 1445,
 1405, 1360, 1325, 1245, 1150.
 NMR : (CDCl_3), 1,15(d)7Hz ($-\underline{\text{CH}}_3$ Ala)/ 1,5(s) ($-\text{C}(\text{CH}_3)_3$)/
 2,25(m) u. 2,55(m) ($\text{N}-\underline{\text{CH}}_2)_5-\text{N}'$)/ 3,42(m) ($\underline{\text{CH}}_2-\text{C}_6\text{H}_5$)/
 3,98(m) ($-\underline{\text{CH}}$ Ala)/ 4,45(m) ($-\underline{\text{CH}}$ Phe)/
 7,35(m) (C_6H_5 Phe)
 MS : 372 (M^+ , $-\text{HCl}$), 329, 316, 299, 281, 273, 271, 269,
 260, 225, 215, 201, 200, 179, 171, 146, 120, 91, 81,
 70, 57, 44, 28.
 Analyse: ber: C 64,60 H 8,13 N 6,90 Cl 8,66
 gef: 64,39 8,06 6,85 8,84

9.4 N,N'-Alkyliden-phenylalanyl-alanyl-t-butylester

Man löst 1 g Alkylidenpeptid Hydrochlorid (9.1.1, 9.2, 9.3) in Wasser, versetzt mit einem Ueberschuss an Triäthylamin, extrahiert das freie Imidazolidinonpeptid mit EtOAc, wäscht mit Wasser, trocknet die Essigesterphase und dampft am Vak ein. Trotz zusätzlicher Reinigung mittels SC (nach Abschnitt 7.3) wird das Methylen- resp. Aethylidenpeptid nur als Oel erhalten; das Cyclohexylidenderivat lässt sich aus n-Hexan-EtOAc (2:1) kristallisieren.

Die IR-, NMR- und MS-Daten der freien Alkylidenpeptidester stimmen mit denjenigen der Hydrochloride (9.1, 9.2, 9.3) überein.

	A%	mp. °C	$[\alpha]_D^{20}$ c=2 EtOH	DC
$\begin{array}{l} \text{[CHH]} \\ \text{Phe-Ala-OBut [29]} \end{array}$	92	Oel	-63°	a/0,60, d/0,68
$\begin{array}{l} \text{[CHR]} \text{ (R=CH}_3\text{)} \\ \text{Phe-Ala-OBut [30]} \end{array}$	79	Oel	-70	a/0,48, 0,53; d/0,49, 0,55 ¹⁾
$\begin{array}{l} \text{[CRR']} \\ \text{Phe-Ala-OBut [31]} \end{array}$	86	113-114	-58	a/0,58, d/0,67 (RR'=(CH ₂) ₅)

- 1) R_f-Werte der beiden möglichen Isomeren (C-2); wird das Aethylidenderivat als Hydrochlorid chromatographiert so ist nur 1 Fleck vorhanden (keine Auftrennung in Isomere).

10. ACYLIERUNG DER N,N'-ALKYLIDEN-DIPEPTIDESTER

10.1 Acylierungsmethoden

10.1.1 Acylierung mit Essigsäureanhydrid

- a) Man löst 100 mg Alkylidenpeptidester in 20 ml MeOH und fügt bei ZT 5 ml Ac_2O zu. Nach 2 h dampft man am Vak zur Trockne ein, nimmt in EtOAc auf, wäscht mit ges. KHCO_3 -Lsg. 2N HCl und Kochsalzlsg., trocknet den EtOAc-Extrakt und dampft am Vak ein.
- b) Man löst 100 mg Alkylidenpeptidester in 10 ml Pyridin und fügt bei ZT 10 ml Ac_2O zu. Nach 4 h versetzt man mit 40 ml Toluol und dampft am Vak zur Trockne ein. Die Aufarbeitung erfolgt wie unter a).

10.1.2 Acylierung mit Benzoylchlorid

Man löst 0,3 mMol Alkylidenpeptidester (9.4) und $39\mu\text{l}$ (0,35 mMol) NMM in 20 ml abs. Toluol und versetzt mit $41\mu\text{l}$ (0,35 mMol) Benzoylchlorid. Nach 2h bei 30°C dampft man am Vak zur Trockne ein, nimmt in EtOAc auf, wäscht mit ges. KHCO_3 -Lsg., 2N HCl, Wasser und Kochsalzlsg., trocknet den EtOAc-Extrakt und dampft am Vak ein.

10.1.3 Acylierung mit Carbobenzoxychlorid (Z-Cl)

Man löst 0,4 mMol Alkylidendipeptidester Hydrochlorid und $89\mu\text{l}$ (0,8 mMol) NMM in 10 ml MeOH, kühlt auf 0°C , fügt 0,12 ml (0,8 mMol) Z-Cl zu, rührt 2 h, fügt weitere 0,12 ml Z-Cl zu und engt das Reaktionsgemisch nach 3 h auf ca. ein Drittel ein, nimmt in EtOAc auf, wäscht mit ges. KHCO_3 -Lsg., 2N HCl und Kochsalzlsg., trocknet den EtOAc-Extrakt und dampft ein.

10.2 N-Acyl-N,N'-Alkyliden-dipeptid-t-butylester

10.2.1 N-Acyl-N,N'-Methylen-dipeptid-t-butylester

N-Benzoyl-N,N'-Methylen-phenylalanyl-alanyl-t-butylester [32]

$C_{24}H_{28}N_2O_4$, MG 408,51

304 mg (1 mMol) Methylen-dipeptidester [29] werden nach 10.1.2 mit 0,18 ml (1,5 mMol) benzoylchlorid umgesetzt. Nach der Reinigung des Rohproduktes (380 mg) mittels SC nach 7.3 erhält man 320 mg (79%) einheitliches Produkt (DC).

mp. : 127-129°C (UK : EtOAc-Petroläther)
DC : d/0,75 $[\alpha]_D^{20}$: +63° (c=1,87 MeOH)
IR : (in KBr), 3420, 2920, 1725, 1700, 1370, 1210, 1155.
MS : 408 (M^+), 352, 351, 335, 317, 307, 303, 261, 247,
236, 185, 157, 139, 132, 120, 111, 105, 91, 77, 57,
56, 44 (vgl. auch Abschnitt 5.1.5).
Analyse: ber: C 70,56 H 6,91 N 6,86
gef: 70,31 6,87 6,93

N-Carbobenzoxo-N,N'-Methylen-phenylalanyl-alanyl-t-butyl- ester [33] $C_{25}H_{30}N_2O_5$, MG 438,54

340 mg (1 mMol) Methylen-dipeptidester Hydrochlorid [23] werden nach 10.1.3 umgesetzt. Nach der Reinigung des Rohproduktes (290 mg) mittels SC nach 7.3 und UK aus EtOAc-n-Hexan erhält man 180 mg (41%) einheitliches Produkt (DC).

mp. : 97-98°C, DC : a/0,70
 $[\alpha]_D^{20}$: +111° (c=1 EtOH)
IR : (in KBr), 2980, 1735, 1700, 1455, 1420, 1370, 1290
1225, 1155, 1115.
MS : 438 (M^+), 382, 381, 365, 347, 337, 309, 303, 291,

MS : 247, 246, 157, 132, 111, 91, 77, 57, 56, 41.

Analyse: ber: C 68,47 H 6,90 N 6,39
gef: 68,32 6,82 6,35

10.2.2 N-Acyl-N,N'-Aethyliden-dipeptid-t-butylester

N-Acetyl-N,N'-Aethyliden-phenylalanyl-alanyl-t-butylester [34]

$C_{20}H_{28}N_2O_4$, MG 360,46

320 mg (1 mMol) Aethyliden-dipeptidester und 10 ml Ac_2O werden nach 10.1.1a bei 50°C während 3 h umgesetzt. Nach der Reinigung des Rohproduktes (210 mg) mittels Dickschichtchromatographie nach 7.2 erhält man 140 mg (38%) einheitliches Produkt.

mp. : 92-95°C, $[\alpha]_D^{20}$: +69° (c=2,7 MeOH)

DC : a/0,64, c/0,83, d/0,71

IR : (in KBr), 2940, 1730, 1695, 1445, 1370, 1210, 1150.

MS : 360 (M^+), 345, 304, 303, 287, 269, 259, 213, 168,
153, 146, 125, 120, 91, 77, 57, 43.

Analyse: ber: C 66,64 H 7,83 N 7,77
gef: 66,37 7,91 7,69

N-Benzoyl-N,N'-Aethyliden-phenylalanyl-alanyl-t-butylester [35]

$C_{25}H_{30}N_2O_4$, MG 422,54

320 mg (1 mMol) Aethyliden-dipeptidester [30] werden nach 10.1.2 mit 0,18 ml (1,5 mMol) Benzoylchlorid bei 40°C während 4 h umgesetzt. Nach der Reinigung des Rohproduktes (285 mg) mittels Dickschichtchromatographie nach 7.2 erhält man 198 mg (47%) einheitliches Produkt (DC).

mp. : 116-117°C (UK : EtOAc-Petroläther)

DC : d/0,77

$[\alpha]_D^{20}$: $+73^\circ$ ($c=2,1$ MeOH)
IR : (in KBr), 2960, 1735, 1695, 1455, 1415, 1365,
1215, 1145.
MS : 422 (M^+), 407, 366, 349, 331, 321, 317, 275, 261, 258,
230, 188, 153, 146, 125, 105, 91, 77, 57.
Analyse: ber: C 71,06 H 7,16 N 6,63
gef: 70,93 7,27 6,58

N-Carbobenzoxo-N,N'-Aethyliden-phenylalanyl-alanyl-t-butyl-
ester [36] $C_{26}H_{32}N_2O_5$, MG 452,56

354 mg (1 mmol) Aethyliden-dipeptidester Hydrochlorid [27] werden nach 10.1.3 umgesetzt. Nach der Reinigung des Rohproduktes (362 mg) mittels SC nach 7.3 erhält man 300 mg (67%) einheitliches Produkt, das aus EtOAc-Petroläther umkristallisiert 210 mg (46%) Reinprodukt ergibt.

mp. : 114-115 $^\circ$, DC : a/0,74
 $[\alpha]_D^{20}$: $+99^\circ$ ($c=1$ MeOH)
IR : (in CH_2Cl_2), 2930, 1730, 1710, 1695, 1445, 1425,
1390, 1370, 1145.
MS : 452 (M^+), 437, 396, 395, 379, 361, 351, 323, 317,
305, 261, 171, 146, 125, 107, 105, 104, 91, 92, 79,
77, 70, 65, 57, 56, 44, 41.
Analyse: ber: C 69,00 H 7,13 N 6,19
gef: 68,85 7,07 6,01

11. SYNTHESE NICHTTERMINALER N,N'-ALKYLIDEN-TRYPEPTIDE

11.1 Geschützte N,N'-Alkyliden-tripeptide

11.1.1 Kupplungsmethoden

11.1.1.1 Kupplungen unter Verwendung gemischter Kohlensäure-anhydride METHODE A

Man löst 4,2 mMol N-geschützte Aminosäure und 0,45 ml (4 mMol) NMM in 20 ml DMF, kühlt auf -15°C und fügt 0,52 ml (4 mMol) CAIE zu. Nach 12 Min. tropft man dazu eine Lsg. von 2 mMol N,N'-Alkyliden-dipeptid-t-butylester Hydrochlorid und 0,22 ml (2 mMol) NMM in 10 ml DMF. Das Reaktionsgemisch wird bei -10° bis $+10^{\circ}\text{C}$ (je nach Art der Reaktionspartner) bis zur vollständigen Umsetzung (DC, FM a) gerührt. Sodann zerstört man den Anhydrid-Ueberschuss bei 0°C durch Zutropfen von ges. KHCO_3 -Lsg. bis zum pH ca. 8, rührt 30 Min. bei ZT, nimmt in 80 ml EtOAc auf, wäscht mit ges. KHCO_3 -Lsg., 2N HCl, Wasser und Kochsalzlsg., trocknet den EtOAc-Extrakt und dampft am Vak ein. Das Rohprodukt wird aus EtOAc-Petroläther kristallisiert.

11.1.1.2 Kupplungen unter Verwendung von Dicyclohexyl-carbodiimid METHODE B

Man löst 0,4 mMol N,N'-Alkyliden-dipeptid-t-butylester Hydrochlorid, 44 μl (0,4 mMol) NMM, 0,4 mMol N-geschützte Aminosäure und 82 mg (0,4 mMol) DCCI (FLUKA puriss.) in 4 ml wasserfreiem Methylenchlorid. Nach 16 h bei ZT filtriert man vom ausgefällten DCH (mp. $216-218^{\circ}$) ab, nimmt in 20 ml EtOAc auf, wäscht mit ges. KHCO_3 -Lsg., 2N HCl, Wasser und Kochsalzlsg., trocknet den EtOAc-Extrakt und dampft am Vak ein. Zur voll-

ständigen Abtrennung von DCH ist oft wiederholtes Lösen des Rohproduktes in wenig EtOAc und Filtration vom unlöslichen DCH erforderlich.

11.1.1.3 Kupplungen unter Verwendung von 2-Pyridyl-thiole- estern

a) Synthese der 2-Pyridyl-thiolester

Zu einer auf -18°C gekühlten Lsg. von 10 mMol einer N-Acyl-Aminosäure und 1,11 g (10 mMol) 2-Mercaptopyridin (FLUKA, aus Benzol umkrist., mp. $131-132^{\circ}\text{C}$) in 25 ml EtOAc tropft man langsam eine Lsg. von 2,06 g (10 mMol) DCCI (FLUKA puriss.) in 15 ml EtOAc. Man rührt 30 Min. bei -18°C und lässt die Lsg. sodann auf ZT erwärmen. Nach 16 h filtriert man vom unlösl. DCH ab und dampft am Vak ein. (Vollständige Abtrennung von DCH : vgl. 11.1.1.2). UK des Rohprod. aus EtOAc-Petroläther.

	A%	mp. $^{\circ}\text{C}$		$[\alpha]_{\text{D}}^{20}$		DC
		beob.	Lit.	beob.	Lit.	
Z-Gly-SPy	81	67-69	65-68			a/0,42
Z-Val-SPy	92	0e1	0e1	-25°	-27°	a/0,59

(Lit.werte: (26), 2-Mercaptopyridin: a/0,23.

b) Allg. Vorschrift zur Kupplung unter Verwendung von 2-Pyridyl- thioleestern METHODE C

Man löst 0,4 mMol N,N'-Alkyldendipeptidester Hydrochlorid, 44 μl (0,4 mMol) NMM und 120 mg (0,4 mMol) Z-Gly-SPy bei ZT in 4 ml EtOAc. Nach vollständiger Reaktion (DC, FM a) giesst man das Reaktionsgemisch in 10 ml ges. Kochsalzlsg., extrahiert das Produkt mit EtOAc, wäscht mit ges. KHCO_3 -Lsg., 2N HCl,

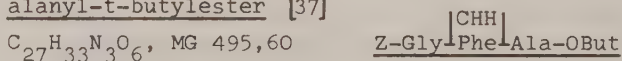
Wasser und Kochsalzlsg., trocknet den Essigester-Extrakt und dampft am Vak ein. Das Rohprodukt wird aus Essigester-Petroläther umkristallisiert.

c) Vorschrift zur Kupplung unter Verwendung eines Ueberschusses an 2-Pyridyl-thiolester METHODE D

Man löst 5 mMol N,N'-Alkylidendipeptidester Hydrochlorid, 0,56 ml (5 mMol) NMM und 3,45 g (10 mMol) Z-Val-SPy in 40 ml EtOAc. Nach 40 h bei 45°C (DC-Kontrolle) giesst man das Reaktionsgemisch in 40 ml Kochsalzlsg., extrahiert das Produkt mit EtOAc und dampft ein. Man nimmt in 20 ml Eisessig auf, fügt 1 g festes Girard T-Reagens zu, lässt 20 h bei ZT stehen, dampft den Eisessig am Vak ab, nimmt in 40 ml EtOAc auf, wäscht mit ges KHCO₃-Lsg., 2N HCl, Wasser und Kochsalzlsg., trocknet den EtOAc-Extrakt und dampft am Vak ein.

11.1.2 N-(α-Aminoacyl)-N,N'-Methylen-dipeptid-t-butylester

11.12.1 N-(Carbobenzoxymethyl)-N,N'-Methylen-phenylalanyl-alanyl-t-butylester [37]



a) Nach METHODE A werden 4,08 g (12 mMol) $\begin{array}{c} | \text{CHH} | \\ \text{Phe-Ala-OBut} \end{array} \cdot \text{HCl}$ [23] und 1,34 ml (12 mMol) NMM mit 18 mMol Z-Gly-gem.Anhydrid (aus 4g (19 mMol) Z-Gly) bei - 15°C während 24 h umgesetzt. 5,8 g (98%) Rohprodukt ergeben nach UK (EtOAc-Petroläther) 5,08 g (85%) Methylenpeptidester.

mp. : 153-154°C $[\alpha]_D^{20}$: +134° (c=0,3 MeOH)
DC : a/0,75, f/0,84 UV : vgl. 5.1.1, Tabelle p. 64
A%, RZ : vgl. 3.2.1.1, Tabelle p. 40

IR : (in KBr), 3315, 2980, 1735, 1715, 1700, 1665, 1540, 1455, 1385, 1365, 1290, 1245, 1225, 1155, (Teilspektrum vgl. 5.1.3, Fig. III, p. 70)

NMR : (in DMSO- d_6), 0,9(d)7Hz ($-CH_3$ Ala)/ 1,40(s) ($C(CH_3)_3$)/ 3,3(m) ($-CH_2-C_6H_5$)/ 3,86(d)5Hz u. 4,08(d)5Hz ($-CH_2-$ Gly) 3,77(d)9Hz u. 4,63(d)9Hz ($N-CH_2-N'$)/ 4,7(qa)7Hz ($-CH$ Ala)/ 5,0(m) ($-CH$ Phe)/ 5,15(s) ($-CH_2-Z$)/ 5,75 (NH Gly)/7,2(m) (C_6H_5 Phe)/ 7,4(s) (C_6H_5 Z) (vgl. 5.1.4.2, Tabelle p. 77)

MS : 495 (M^+), 439, 422, 404, 394, 348, 331, 330, 303, 247, 240, 157, 132, 120, 111, 108, 107, 91, 79, 77, 65, 57, 56, 44, 41, 29 (vgl. 5.1.5, Tabelle p.82)

Analyse: ber: C 65,44 H 6,71 N 8,48
gef: 65,17 6,59 8,68

b) Nach METHODE B werden 0,68 g (2 mMol) $\begin{matrix} |CHH| \\ Phe-Ala-OBut.HCl \end{matrix}$ [23], 0,23 ml (2 mMol) NMM und 0,42 g (2 mMol) Z-Gly mit 0,41 g (2 mMol) DCCI bei ZT und 16 h umgesetzt. Nach UK (EtOAc-Petrol-äther) erhält man 0,62 g (68%) Methylenpeptidester.

mp. : 153-154°C $[\alpha]_D^{20}$: +132° (c=0,3 MeOH)
DC : a/0,75, f/0,85
Analyse: ber: C 65,44 H 6,71 N 8,48
gef: 65,31 6,82 8,57

UV, IR, NMR, MS : wie unter a)

c) Nach METHODE C werden 136 mg (0,4 mMol) $\begin{matrix} |CHH| \\ Phe-Ala-OBut.HCl \end{matrix}$ [23] 45 μ l (0,4 mMol) NMM und 120 mg (0,4 mMol) Z-Gly-SPy bei ZT während 16 h umgesetzt. 191 mg (96%) Rohprodukt ergeben nach UK (EtOAc-Petroläther) 158 mg (81%) Methylenpeptidester.

mp. : 154-155°C DC a/0,73
 $[\alpha]_D^{20}$: +135° (c=0,3 MeOH)

UV, IR, NMR, MS : wie unter a)

11.1.2.2 N-(Carbobenzoxy-valyl)-N,N'-Methylen-phenylalanyl-
alanyl-t-butylester [38]

$C_{30}H_{39}N_3O_6$, MG 537,66



a) Nach METHODE D werden 1,02 g (3mMol) $\begin{array}{c} | \text{CHH} | \\ \text{Phe-Ala-OBut.HCl} \end{array}$ [23] 0,34 ml (3 mMol) NMM und 2,06 g (6 mMol) Z-Val-Spy in 20 ml EtOAc bei 40°C während 48 h umgesetzt. Nach 48 stg. Trocknen am Vak erhält man 1,37 g (85%) DC-einheitliches Rohprodukt. Davon lassen sich 0,52 g (38%) aus EtOAc-Petroläther krist.

mp. : 163-165°C $[\alpha]_D^{20}$: +86° (c=0,3 MeOH) DC : a/0,78
IR : (in CHCl_3), 3430, 2970, 1735, 1720, 1705, 1655, 1500, 1455, 1430, 1370, 1290, 1155.
NMR : (in DMSO-d_6), 0,9(d)7Hz ($-\text{CH}_3$ Ala)/ 0,97(d)6Hz ($-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ Val)/ 1,41(s) ($-\text{C}(\text{CH}_3)_3$)/ 2,0(m) ($-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ Val)/ 3,3(m) ($-\text{CH}_2-\text{C}_6\text{H}_5$)/ 4,05(d)6Hz ($-\text{CH}$ Val)/ 4,06(d)9Hz u. 4,7(d)9Hz ($\text{N}-\text{CH}_2-\text{N}'$)/ 4,68(qa)7Hz ($-\text{CH}$ Ala)/ 5,1(m) ($-\text{CH}$ Phe)/ 5,18(s) ($-\text{CH}_2-$ Z)/ 5,57(d)8Hz (NH Phe)/ 7,1 u. 7,27 (C_6H_5 Phe)/ 7,406s (C_6H_5 Z)/ (vgl. 5.1.4.2, Tabelle p. 77)
MS : 537 (M^+), 481, 464, 446, 436, 386, 303, 247, 234, 213, 206, 162, 157, 132, 120, 111, 108, 107, 103, 91, 83, 79, 77, 72, 65, 56.

Analyse: ber: C 67,01 H 7,31 N 7,82
gef: 66,92 7,39 7,89

b) Nach METHODE B werden 0,68 g (2 mMol) $\begin{array}{c} | \text{CHH} | \\ \text{Phe-Ala-OBut.HCl} \end{array}$ [23] 0,23 ml (2 mMol) NMM und 0,5 g (2 mMol) Z-Val mit 0,41 g (2mMol) DCCI bei ZT während 24 h umgesetzt. Man erhält 0,87 g (81%) farbloses Oel (einheitlich nach DC), das sich nicht krist. lässt.

DC : a/0,8 $[\alpha]_D^{20}$: +80° (c=0,3 MeOH)

IR, MS : wie unter a)

11.1.2.3 Tabelle der N-(α -Aminoacyl)-N,N'-Methylen-dipeptid-
t-butylester

	M	A%	RZ h	T°C	mp. °C	$[\alpha]_D^{20}$ c=0,3 MeOH	DC
Z-Gly- $\begin{array}{c} CHH \\ \text{Phe} \end{array}$ -Ala-OBu [37]	(A)	85	24	-15	153-154	+134	a/0,75
	(B)	69	16	+25	153-154	+132	a/0,75
	(C)	81	16	+25	154-155	+135	a/0,73
Z-Val- $\begin{array}{c} CHH \\ \text{Phe} \end{array}$ -Ala-OBu [38]	(B)	81	24	+25	0el	+ 80	a/0,80
	(D)	38	48	+40	163-165	+ 86	a/0,78
Z-Ala- $\begin{array}{c} CHH \\ \text{Phe} \end{array}$ -Ala-OBu [39]	(A)	72	48	-15	0el	+ 78	a/0,8
Pht-Gly- $\begin{array}{c} CHH \\ \text{Phe} \end{array}$ -Ala-OBu [40]	(A)	82	6	-10	0el	+126	a/0,74
	(B)	58	48	+25	0el	+129	a/0,73
Pht-Leu- $\begin{array}{c} CHH \\ \text{Phe} \end{array}$ -Ala-OBu [41]	(A)	49	24	+10	188-191	+118	a/0,82
Z-Gly- $\begin{array}{c} CHH \\ \text{Phe} \end{array}$ -Val-OBu [42]	(A)	86	16	-15	165-166	+ 97	a/0,77
	(B)	68	16	+25	163-165	+ 98	a/0,77
Z-Gly- $\begin{array}{c} CHH \\ \text{Phe} \end{array}$ -Leu-OBu [43]	(A)	85	16	-15	156-157	+105	a/0,8
	(C)	72	24	+25	156-158	+ 99	a/0,82
Z-Gly- $\begin{array}{c} CHH \\ \text{Phe} \end{array}$ -Phe-OBu [44]	(A)	82	16	-10	140-141	+ 35	a/0,84
	(B)	72	48	+25	138-139	+ 34	a/0,84

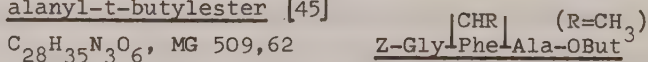
Hinweise betr. UV-, IR-, NMR- und MS-Daten der obigen Peptide
finden sich in den Abschnitten 5.1.1, 5.1.2, 5.1.3, 5.1.4.2
und 5.1.5 (vgl. Tabellen auf p. 64,77 und 82)

Analysenwerte der N-(α -Aminoacyl)-N,N'-Methylen-dipeptid-t-butylester (11.1.2.3)

M	Summen- formel	Analyse
Z-Gly- $\begin{array}{c} \text{CHH} \\ \text{Phe-Ala-OBut} \end{array}$ [37] (A)	$\text{C}_{27}\text{H}_{33}\text{N}_3\text{O}_6$	ber: C 65,44 H 6,71 N 8,48 gef: 65,17 6,59 8,68
Z-Val- $\begin{array}{c} \text{CHH} \\ \text{Phe-Ala-OBut} \end{array}$ [38] (D)	$\text{C}_{30}\text{H}_{39}\text{N}_3\text{O}_6$	ber: C 67,01 H 7,31 N 7,82 gef: 66,92 7,39 7,89
Z-Ala- $\begin{array}{c} \text{CHH} \\ \text{Phe-Ala-OBut} \end{array}$ [39] (A)	$\text{C}_{28}\text{H}_{35}\text{N}_3\text{O}_6$	ber: C 65,99 H 6,92 N 8,25 gef: 65,67 6,88 8,31
Pht-Gly- $\begin{array}{c} \text{CHH} \\ \text{Phe-Ala-OBut} \end{array}$ [40] (A)	$\text{C}_{27}\text{H}_{29}\text{N}_3\text{O}_6$	ber: C 65,98 H 5,94 N 8,55 gef: 65,84 5,87 8,61
Pht-Leu- $\begin{array}{c} \text{CHH} \\ \text{Phe-Ala-OBut} \end{array}$ [41] (A)	$\text{C}_{31}\text{H}_{37}\text{N}_3\text{O}_6$	ber: C 67,99 H 6,81 N 7,67 gef: 68,05 6,89 7,69
Z-Gly- $\begin{array}{c} \text{CHH} \\ \text{Phe-Val-OBut} \end{array}$ [42] (B)	$\text{C}_{29}\text{H}_{37}\text{N}_3\text{O}_6$	ber: C 66,52 H 7,12 N 8,02 gef: 66,64 7,21 7,98
Z-Gly- $\begin{array}{c} \text{CHH} \\ \text{Phe-Leu-OBut} \end{array}$ [43] (C)	$\text{C}_{30}\text{H}_{39}\text{N}_3\text{O}_6$	ber: C 67,01 H 7,31 N 7,82 gef: 66,89 7,27 7,86
Z-Gly- $\begin{array}{c} \text{CHH} \\ \text{Phe-Phe-OBut} \end{array}$ [44] (A)	$\text{C}_{33}\text{H}_{37}\text{N}_3\text{O}_6$	ber: C 69,33 H 6,52 N 7,35 gef: 69,48 6,61 7,36

11.1.3 N-(α -Aminoacyl)-N,N'-Aethyliden-dipeptid-t-butylester

11.1.3.1 N-(Carbobenzoxo-glycyl)-N,N'-Aethyliden-phenylalanyl-alanyl-t-butylester [45]



Nach METHODE A werden 1,42 g (4 mMol) $\begin{array}{c} | \text{CHR} | \\ \text{Phe-Ala-OBut.HCl} \end{array}$ [27] und 0,45 ml (4 mMol) NMM mit 8 mMol Z-Gly-gem.Anhydrid (aus

1,77 g (8,5 mMol) Z-Gly) bei 10°C während 24 h umgesetzt.
 1,73 g (85%) Rohprodukt ergeben nach UK (CHCl₃-Petroläther)
 0,95 g (47%) Z-Gly-Phe^[CHH]-Ala-OBu^t.

mp. : 102-105°C (α_D^{20} : +32° (c=1 EtOH) DC : a/0,77
 IR : (in KBr), 3300, 2970, 1730, 1720, 1695, 1640, 1445,
 1410, 1370, 1215, 1155.
 MS : 509 (M⁺), 494, 453, 436, 418, 408, 362, 345, 344, 330,
 317, 300, 261, 254, 171, 146, 125, 108, 107, 91, 79,
 77, 70, 57, 56, 44, 41. (vgl. 5.1.5, Tabelle p. 82)
 Analyse: ber: C 65,99 H 6,92 N 8,25
 gef: 66,12 6,87 8,19

11.1.3.2 N-(Carbobenzoxy-valyl)-N,N'-Aethyliden-phenylalanyl-
alanyl-t-butylester [46]

C₃₁H₄₁N₃O₆, MG 551,68 Z-Val^[CHR]-Phe^[CHR]-Ala-OBu^t³ (R=CH₃)

Nach METHODE D: 1,06 g (3 mMol) Phe^[CHR]-Ala-OBu^t.HCl [27], 0,34 ml
 (3 mMol) NMM und 2,06 g (6 mMol) Z-Val-SPy in 15 ml EtOAc
 werden bei 45°C während 50 h umgesetzt. Das DC (FM a) zeigt,
 dass das eine Isomere (a/0,55) des Aethylidendi-peptidesters
 bevorzugt reagiert; nach 50 h kann nur noch ein Isomeres (a/0,49)
 festgestellt werden. Nach Aufarbeitung und Reinigung mittels
 SC (nach 7.3) erhält man 0,645 g (39%) Rohprodukt, das sich
 nicht krist. lässt.

DC : Prod. a/0,72, CTR-pos. Verunreinigung a/0,82
 NHR-pos. Verunreinigung a/0,28 (ev. 2-Mercaptopyridin)

IR : (in CHCl₃), 3415, 2960, 1735, 1725, 1710, 1665,
 1505, 1445, 1435, 1385, 1365, 1290, 1145.
 MS : 551 (M⁺), 495, 478, 460, 450, 317, 261, 234, 206,
 171, 146, 125, 91, 77, 57, 56, 44, 41.

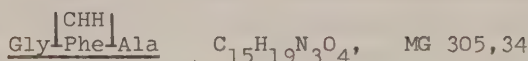
11.2 Freie N,N'-Alkyliden-tripeptide

11.2.1 Abspaltung der Schutzgruppen

Die Schutzgruppen der Z-Alkylidentripeptid-t-butylester (11.1) werden mit TFA (t-Butyl) und H_2/Pd (Z) abgespalten. Die Abspaltungsverfahren sind für die unverbrückten Peptide in den Abschnitten 8.5.1.1 und 8.5.1.2 beschrieben. Diese Vorschriften gelten auch für verbrückte Peptide.

11.2.2 N-(α -Aminoacyl)-N,N'-Methylen-dipeptide

11.2.2.1 N-Glycyl-N,N'-Methylen-phenylalanyl-alanin [47]

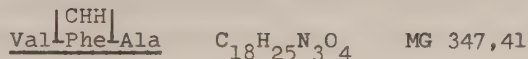


Aus 4,96 g (10 mmol) Z-Gly $\overset{\text{CHH}}{\underset{|}{\text{Phe}}}$ -Ala-OBu [37] erhält man nach der Abspaltung der t-Butylgruppe mit TFA und UK des Rohprod. aus Aceton-Petroläther 3,45 g (81%) Z-Gly $\overset{\text{CHH}}{\underset{|}{\text{Phe}}}$ -Ala-OH vom mp. 170–171°C. Die Hydrogenolyse von 2,55 g (5,8 mmol) Z-Gly $\overset{\text{CHH}}{\underset{|}{\text{Phe}}}$ -Ala-OH mit 0,6 g Pd-Kohle ergibt 1,7 g Gly $\overset{\text{CHH}}{\underset{|}{\text{Phe}}}$ -Ala (96%). Die Gesamtausbeute nach beiden Abspaltungsschritten beträgt 77%.

mp. : 213–214°C DC : b/0,28, e/0,29
 $[\alpha]_D^{20}$: +140° (c=0,2 Wasser) resp. +172° (c=2 HAc)
 UV : (vgl. 5.1.1)
 IR : (in KBr), 3440, 2920, 1705, 1700, 1640, 1595, 1450, 1390, 1310, 1185.
 MS : 305 (M^+), 288, 260, 246, 171, 157, 146, 139, 120, 111, 91, 83, 77, 41, 28.
 Analyse: ber: C 59,00 H 6,27 N 13,76
 gef: 59,34 6,34 13,81

NMR : (in D₂O, vgl. 5.1.4.2 Tabelle p. 77), 0,93(d) 7Hz
 (-CH₃ Ala)/ 3,28(m) (-CH₂-C₆H₅)/ 3,93 (-CH₂- Gly)/
 4,07 u. 4,84 (N-CH₂-N')/ 4,38(qa)7Hz (-CH Ala)/
 4,89(m) (-CH Phe)/ 7,10(m)2H u. 7,33(m)3H (C₆H₅ Phe).

11.2.2.2 N-Valyl-N,N'-Methylen-phenylalanyl-alanin [48]



mp. : 194-196°C A% : 68% DC : b/o,36, e/o,37
 [α]_D²⁰ : +176° (c=2 HAc) UV : vgl. Tabelle p. 64
 IR : (in KBr), 3400, 2960, 1715, 1695, 1660, 1615 1450,
 1390, 1290, 1195.
 MS : 347 (M⁺), 330,304,276,247,228,175,157,146,139,132,
 128,120,111,102,91,85,83,77,72.
 Analyse: ber: C 62,23 H 7,25 N 12,09
 gef: 62,09 7,14 12,12

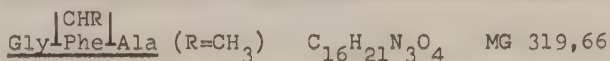
11.2.2.3 Tabelle der N-(α-Aminoacyl)-N,N'-Methylen-dipeptide

	A%	mp. °C	[α] _D ²⁰ c=2 HAc	DC	Analyse
1)					
Gly $\begin{array}{c} \text{CHH} \\ \\ \text{Phe} \end{array}$ Val [49]	74	230-231	+110	b/o,32 e/o,34	ber: C 61,24 H 6,95 gef: 61,11 7,01
Gly $\begin{array}{c} \text{CHH} \\ \\ \text{Phe} \end{array}$ Leu [50]	81	222-224	+147	b/o,33 e/o,36	ber: C 62,23 H 7,25 gef: 62,12 7,36
Gly $\begin{array}{c} \text{CHH} \\ \\ \text{Phe} \end{array}$ Phe [51] 2)	69	223-227	+ 27	b/o,34 e/o,38	ber: C 66,12 H 6,08 gef: 65,98 6,12

- 1) A% : Gesamtausbeute nach beiden Abspaltungsschritten.
- 2) UV- und CD-Daten : vgl. p.64 u. p.67.

11.2.3 N-(α -Aminoacyl)-N,N'-Aethyliden-dipeptide

11.2.3.1 N-Glycyl-N,N'-Aethyliden-phenylalanyl-alanin [52]



Aus 1,44 g (2,8 mMol) Z-Gly $\begin{array}{c} | \text{CHR} | \\ \text{Phe} \end{array}$ Ala-OBut [45] erhält man nach der Abspaltung der t-Butylgruppe 1,04 g (81%) gelbes Oel, das ohne weitere Reinigung zu 0,61 g (83%) Gly $\begin{array}{c} | \text{CHR} | \\ \text{Phe} \end{array}$ Ala hydriert wird. Zur Abtrennung gelber Nebenprodukte (ev. verursacht durch TFA bei der t-Butylester-Spaltung) wird das Rohprodukt zwischen EtOAc und Wasser verteilt, die EtOAc-Phase abgetrennt, getrocknet und am Vak eingedampft. Nach UK aus MeOH-Wasser erhält man 0,25 g (34%) einheitliches Peptid (DC).

- mp. : 174-176°C $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$: +69° (c=1,2 HAc)
- DC : b/0,35, e/0,33
- IR : (in KBr), 3400, 3320, 2930, 2570, 1690, 1665, 1570, 1450, 1415, 1385, 1355, 1265, 1220.
- NMR : (in D₂O, H₂O entkoppelt (teilweise) durch Einstrahlen 90MHz bei 3570 Hz), 0,87(d) ($-\text{CH}_3$ Ala)/ 1,24(d)6Hz u. 1,3(d)6Hz (N-CH(CH_3)-N')/ 3,22(m) ($-\text{CH}_2$ -C₆H₅)/ 3,84(m) ($-\text{CH}$ Phe)/ 4,3 ($-\text{CH}$ Ala)/ 4,44(s) ($-\text{CH}_2$ Gly)/ 7,15(m)2H u. 7,35(m)3H (C₆H₅ Phe).
- MS : 319 (M⁺), 302, 290, 289, 274, 261, 260, 247, 228, 200, 185, 184, 171, 153, 146, 131, 128, 125, 120, 116, 103, 91, 85, 83, 77.
- Analyse: ber: C 60,17 H 6,63 N 13,16
gef: 60,01 6,85 13,42

ZUSAMMENFASSUNG

Das in der Einleitung vorweggenommene Resultat: - die Möglichkeit der Synthese nichtterminaler N,N'-Alkylidetripeptide durch schrittweisen Aufbau über terminal verbrückte Alkylidendipeptide - fusst auf einer sorgfältigen Studie der Aminoacylierbarkeit terminaler N,N'-Alkylidenpeptide.

Zu diesem Zweck wurden terminale Alkylidendipeptide aus verschiedenen Dipeptidestern und Acetaldehyd, Formaldehyd und Cyclohexanon synthetisiert und ihre chemischen Eigenschaften untersucht. Dabei zeigte sich, dass Methylen- und Aethylidenderivate trotz stark verminderter Basizität sich mit verschiedenen Acylierungsmitteln (Essigsäureanhydrid, Benzoylchlorid, Carbobenzoxychlorid) unter drastischen Bedingungen in die 1-Acyl-derivate überführen lassen. Das Cyclohexylidenderivat widerstand auf Grund der grossen sterischen Hinderung jeder Acylierung.

Methylen- und Aethylidendipeptidester lassen sich aber auch mit ausgewählten carboxylaktivierten N-geschützten Aminosäuren zu nichtterminalen N,N'-Alkylidetripeptiden umsetzen. Als geeignet erwiesen sich folgende carboxylaktivierte Derivate: gemischte Kohlensäureanhydride, 2-Pyridyl-thiolester und O-Acyl-iso-dicyclohexylharnstoffe.

Während sich terminale Methylen- und Aethylidendipeptidester mit diesen Methoden und Z-Gly, Z-Ala, Z-Val, Pht-Gly und Pht-Leu mit guter Ausbeute in nichtterminale N,N'-Methyl- und Aethylidetripeptidester überführen liessen und reine, charakterisierte Produkte lieferten, gelang die Synthese nichtterminaler N,N'-Aethylidetripeptidester nur mit Z-Gly.

Anhand eines Vergleichs der N,N'-Methylentripeptide mit homologen unverbrückten Tripeptiden mittels spektroskopischer Methoden (UV, CD, IR, NMR, MS) und chemischer Reaktionen (Hydrogenolyse, Acidolyse und Enzymreaktionen) werden die Auswirkungen der Einführung einer Alkylidengruppe an einer bestimmten Stelle innerhalb eines Peptids (Fixierung der beteiligten Peptidbindungen und entsprechende Einschränkung der Anzahl möglicher Konformationen, Wegfall der Wasserstoffbrückenbildung, Beeinflussung der enzymatischen Spaltbarkeit der Peptidbindung) diskutiert.

LITERATURVERZEICHNIS

- (1) A.C.Davis, A.L.Levy, J.Chem.Soc. 1951, 3479
- (2) U.Zehavi, D.Ben-Ishai, J.Org.Chem. 26, 1079 (1961)
- (3) C.A.Panetta, P.Pesh-Imam, J.Org.Chem. 37, 302 (1972)
- (4) G.A.Hardcastle, D.A.Johnson, C.A.Panetta, J.Org.Chem. 31, 897 (1966)
- (5) V.J.Hruby, D.Yamashiro, V.du Vigneaud, J.Amer.Chem.Soc. 90, 7106 (1968)
- (6) R.Schwyzer, B.Iselin, H.Kappeler, B.Riniker, H.Zuber, Helv. 41, 1287 (1958)
- (7) R.Schwyzer, P.Sieber, Helv. 49, 134 (1966)
- (8) F.Cardinaux, M.Brenner, Helv. 56, 339 (1973)
F.Cardinaux, Diss. Basel 1972
- (9) C.A.Panetta, T.G.Casanova, C.C.Chu, J.Org.Chem. 38, 128 (1973)
- (10) Y.Ariyoshi, N.Sato, Bull.Chem.Soc.Japan 45, 2015 (1972)
- (11) L.W.Daasch, U.E.Hanninen, J.Amer.Chem.Soc. 72, 3673 (1950)
- (12) A.H.Cook, I.Heilbron, A.L.Levy, J.Chem.Soc. 1948, 201
A.H.Cook, I.Heilbron, A.P.Mahadevan, J.Chem.Soc. 1949, 1061
- (13) A.C.Cope, E.M.Hancock, J.Amer.Chem.Soc. 64, 1503 (1942)
66, 1453 (1944), 66, 1738 (1944), 66, 1747 (1944)
- (14) T.A.K.Smith, H.Stephen, Tetrahedron 1, 38 (1957)
- (15) Yoshiro Ogata, Atsushi Kawasaki in 'The Chemistry of the Carbonyl Group', Vol. 2 p. 1 (Ed. S.Patai, Interscience, London 1970)

- (16) Houben-Weyl, 'Methoden der organischen Chemie', Band III, Teil 2 (Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1955)
- (17) I. Gyenes, 'Titrations in nichtwässrigen Medien' (Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart 1970)
- (18) E.J.Cohn, J.T.Edsall, 'Proteins, Amino Acids and Peptides' (Reinhold, New York 1943)
- (19) J.Clark, D.D.Perrin, Quart.Rev. 18, 295 (1964)
- (20) H.K.Hall, J.Amer.Chem.Soc. 79, 5441 (1957)
- (21) J.Taft, J.Amer.Chem.Soc. 74, 3120 (1952), 75, 4231 (1953)
- (22) J.T.Edward, J.Lantos, Can.J.Chemistry 45, 1925 (1967)
- (23) P.G.Ferrini, A.Marxer, Helv. 46, 1207 (1963)
- (24) M.A.Tilak, Tetrah.Letters 11, 849 (1970)
- (25) J.C.Sheehan, G.P.Hess, J.Amer.Chem.Soc. 77, 1067 (1955)
- (26) K.Lloyd, G.T.Young, J.Chem.Soc. 1971, 2890
- (27) T.Wieland, H.Bernhard, Ann. 572, 190 (1951)
- (28) R.A.Boissonnas, Helv. 34, 874 (1951)
- (29) J.R.Vaughan, R.L.Osato, J.Amer.Chem.Soc. 74, 676 (1952)
- (30) N.F.Albertson, Org. Reactions 12, 157 (1962)
- (31) G.W.Anderson, J.E.Zimmerman, F.M.Callahan, J.Amer.Chem. Soc. 89, 5012 (1967)
- (32) N.A.Leister, D.S. Tarbell, J.Org.Chem. 23, 1152 (1958)
- (33) J.C.Sheehan, J.J.Hlavka, J.Org.Chem. 21, 439 (1956)
- (34) R.W.Roeske, J.Org. Chem. 28, 1251 (1963), Chem.Ind. 1959, 1121
- (35) B.J.Litmann, J.A.Schellman, J.Phys.Chem. 69, 978 (1965)
- (36) D.W.Urry, J.Phys.Chem. 72, 3035 (1968)

- (37) J.E.Shield, Biochemistry 5, 1041 (1966)
- (38) R.Schwyzer, J.P.Gorup, H.Nolting, T.K.Aung, Helv. 47, 441 (1964)
- (39) P.S.Rees, D.P.Tong, G.T.Young, J.Chem.Soc. 1954, 662
- (40) F.Weygand, H.Fessel, K.Sun Sun, Z. Naturforsch. 20b, 1169 (1965)
- (41) R.A.Boissonnas, J.Schuhmann, Helv. 35, 2235 (1952)
- (42) R.L.Huegenin, R.A.Boissonnas, Helv. 44, 213 (1961)
- (43) K.Jost, J.Rudinger, F.Sorm, Coll.Cz.Chem.Comm. 26, 2496 (1961)
- (44) E.Stahl, 'Dünnschichtchromatographie' (Springer Verlag, 2.Aufl. 1966)
- (45) Biochemisches Taschenbuch Teil II, (Springer Verlag, 2.Aufl. 1964)
- (46) N.Bjerrum, Chem.Reviews 16, 287 (1935)
- (47) N.A.Ismailow, Z.fiz.Chim. 23, 639 (1949), 23, 647 (1949)
- (48) N.F.Hall, J.Amer.Chem.Soc. 52, 5115 (1930)
- (49) R.P.Bell in 'The Proton in Chemistry' p. 44 (Cornell University Press, New York 1959)
- (50) M.Bergman, L.Zervas, Ber. 65, 1192 (1932)
- (51) IUPAC-IUB, J.Biol.Chemistry 241, 2491 (1966)

LEBENS LAUF

Als Sohn des Erwin Dürrenberger von Lupsingen (BL) und der Martha, geb. Biedermann, wurde ich, Heinz Dürrenberger, am 24. Oktober 1947 in Basel geboren.

Nach Primar- und Realschule besuchte ich das Gymnasium des Kantons Basel-Landschaft in Liestal, wo ich im Herbst 1966 die Maturitätsprüfung Typus C bestand.

Im Wintersemester 1966/1967 immatrikulierte ich mich an der Universität Basel und belegte Chemie als Hauptfach und Mathematik, Physik, physikalische Chemie und Astronomie als Nebenfächer. Im Oktober 1968 bestand ich das erste Vordiplom (anorganische Chemie, organische Chemie und Mathematik), im Oktober 1969 das zweite Vordiplom (Physik, Astronomie) und im November 1970 das Diplom-examen (anorganische Chemie, organische Chemie, physikalische Chemie), das im Frühjahr 1971 vom Prüfungsausschuss von Kandidaten des Lehramts an oberen und mittleren Schulen als fachwissenschaftliche Oberlehrerprüfung anerkannt wurde.

Die Arbeit an der vorliegenden Dissertation begann ich unter der Leitung von Prof. M. Brenner im April 1971.

Während meines Studiums besuchte ich Vorlesungen und Praktika der folgenden Dozenten:

H.Balli, E.Baumgartner, W.Becker, M.Brenner, R.Conzelmann, H.Erlenmeyer, S.Fallab, F.Gerson, C.Grob, E.Heilbronner, P.Hemmerich, P.Huber, H.Kuhn, E.Miescher, C.Pascual, B.Prijs, P.Schiess, G.Schwarz, H.Seiler, H.Sigel, Ch.Tamm.

